

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Aspectos moleculares de la enfermedad de McArdle

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Inés García-Consuegra Galiana

Director

Miguel Ángel Martín Casanueva

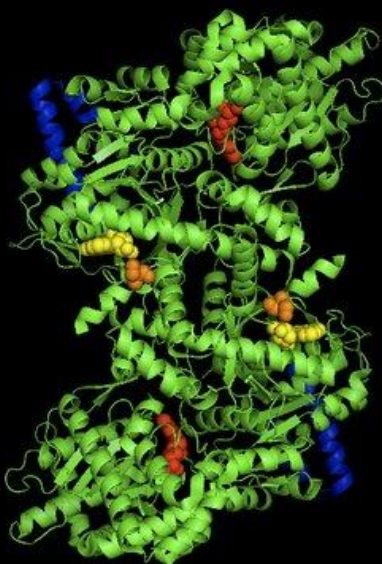
Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



ASPECTOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD DE McARDLE

TESIS DOCTORAL

INÉS GARCÍA-CONSUEGRA GALIANA

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ASPECTOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD DE
McARDLE**

MEMORIA PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR DE:

INÉS GARCÍA-CONSUEGRA GALIANA

Director:

Dr. MIGUEL ÁNGEL MARTÍN CASANUEVA



Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva, Facultativo Especialista de Área del Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario “12 de Octubre” de Madrid.

Certifica que,

Dña. Inés García-Consuegra Galiana, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Enfermedades Mitocondriales y Neurometabólicas del Instituto de Investigación del Hospital “12 de Octubre” de Madrid, el trabajo titulado: “Aspectos moleculares de la enfermedad de McArdle”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Madrid, a 29 de Noviembre de 2011

VºBº del Director

La interesada

Dr. Miguel Ángel Martín Casanueva

Inés García-Consuegra Galiana

A mis abuelas...

Creí que este momento no iba a llegar y lo deje para el final, por eso me encuentro ahora con tantas cosas que decir y, aunque intentaré ser breve, no prometo nada porque soy una de esas personas realmente afortunadas que han tenido la suerte de encontrar en cada peldaño de su vida grandes apoyos a los que agarrarse.

En primer lugar, y porque lo merece, mi director de tesis, el Dr. Martín, que nunca me ha dado por perdida y que siempre me ha animado. Maestro, compañero y amigo, siempre y digo siempre, esperándome con entusiasmo para que este proyecto siguiera adelante, porque de no ser por él no me hallaría hoy aquí. Gracias Miguel.

En segundo lugar al grupo de “los McArdelianos” por hacerme un hueco. Al Dr. Arenas, que comenzó todo esto, al grupo del Dr. Lucia y al grupo del Dr. Andreu, en especial a Gisela, por su inestimable ayuda desde el principio y hasta el final.

A la Dra. Saborido por su paciencia conmigo. Al igual que muchos otros, a lo largo de los años de carrera no sabía muy bien que sería de mí, ella creyó en mí y me dio mi primera oportunidad.

A la Dra. Cabello y al Dr. Ricoy del servicio de Anatomía Patológica por tratarme tan bien desde el día que les conocí, por su tiempo y por su respeto.

A los que han estado y están cada día, los que te abrazan cuando algo no va bien, los que se ríen contigo, los que se alegran de verdad con las cosas buenas que a veces tienes la suerte de que te ocurran. Por esto, primero a JC, desde el día que llegue a este centro estoy pegada a él y es lo mejor que me ha pasado, me ha enseñado todo de todo con la mayor de las sonrisas, aunque le costó al principio eso de sonreír, que es mi compañero y mi amigo, que me aguanta cada día (no sabéis lo que es, porque realmente soy muy cansina), sin él esto no sería nada. Al laboratorio de Bioquímica, en especial a la niñas por dejar que las abrace de vez en cuando: a Pilar, por ser como es y por todo el tiempo que pierde conmigo, a Sara por tener una sonrisa cada día y por intentar tenerla para los demás aunque no sea un buen día para ella, a Laura R, por ser tan generosa, por tener siempre un momento para escucharme. A Aitor por darme los mejores momentos en el arte del *Blue Native*, por ser tan concienzudo y no dejar que me salga siempre con la mía. A Henry, por tener siempre un si en la boca cuando le pides algo, aunque sea una llave allen. Al Sr. B, por su memoria prodigiosa, por ser tan maravilloso siempre. A María Morán, por demostrar que algunas derrotas se pueden convertir en victorias. A la Dra. Cristina Ugalde, por enseñarme a ver en 2D, gracias de verdad. A Lorena (“mi encarna”), a Sandra y a Gabi, por hacerme reír cada vez que voy a verlas. A David, por aguantar tantas preguntas. Al Dr. Alberto García por estar siempre para lo que necesites, por ser como es. A Paz, por ser un encanto con todos y tener siempre un hueco para cualquier pregunta. Al Dr. Martínez Azorín, Paco, porque aunque es murciano, creo que en el fondo es majo, y sobre todo porque sin su ayuda no hubiera sido posible una parte de esta tesis. Y aunque ya no estén físicamente en el

laboratorio a la Dra. Campos, porque es una más y se la echa de menos, y por supuesto al Pelos, porque nadie me ha hecho reír tanto en el trabajo.

A las personas de este centro de investigación que hacen de cada día algo nuevo y sorprendente. A Inma por todo el tiempo que me ha dedicado a lo largo de estos años, y son muchos, por tratarme siempre con respeto, por ayudarme, por enseñarme, por tener un momento siempre, por ser mi amiga. A Sara Porfis por ese gran don culinario que nos alegra el día de vez en cuando y por su generosidad. Al laboratorio de Reuma, porque son todas unas personas excepcionales: Manu, Gabriel, Alicia, Vanessa, las Marías y las Elenas. Al laboratorio de Porfirias, en especial a Ana y a Nuria, que demuestran cada día la eficacia de las nuevas generaciones. Al laboratorio de Psiquiatría, al completo y, en especial, a Noe, nacida para hacer western blot, una de las mejores técnicas con las que he tenido la suerte de trabajar pero que es aún mejor persona, y de ese labo, aunque ya no estén, a Laura E y Adolfo, que terminaron este viaje antes pero que no se olvidan de los que aún estamos en él, siempre animándonos, gracias. Al laboratorio de Neurociencias, por ser tan buenas en su trabajo y ser mejor compañeras, a Eva, a Chelo, a Marta y a Desi. Al laboratorio de onco, gracias por vuestra paciencia con el servicio, a Carlos por ser un friki como yo y orgullosos de ello, y, sobre todo, gracias Teresa por ser tan estupenda como eres. Al Dr. Enríquez de Salamanca, al súper y, cómo no, a Julia, que es un encanto y la alegría de las fiestas de navidad. A Moni, por ser mi bicho, aunque ya no ande dando jaleo por aquí, me viene una sonrisa a la cara cada vez que recuerdo mis primeros días en este centro. A Bego y a Tere, gracias porque un poco de vosotras se quedó por aquí dando vueltas. A Miluchi, gracias.

A mi familia: mis padres, mis hermanos y Dumas, que siempre han estado tan orgullosos de mí para que sigan estándolo aunque la vida me haya llevado a mayor distancia de la que todos querríamos. La familia es una lotería, yo no querría otra papeleta.

A mis amigos de pueblo, que llevan ahí desde siempre, y se les quiere, a Juliejo, a Miriam, a mi Abel, al pequeño, a Juanjo, a Susana, a María, a Concha, a Elena, a Lola, a Carlos y en especial a David, porque siempre ha creído en mí y yo en él, aunque no se lo diga muy a menudo. A Lauriña por ser tan especial y a Ro, por darme las mejores experiencias de los años de universidad. A “la Reina” porque sin ella nada sería igual.

A mi familia de aquí, a mis amigos madrileños, aunque ninguno sea de Madrid, por hacer de mí la mujer que soy hoy. Al Piñe y a Pablo por hacerme reír siempre. A Lauri por haber compartido tanto conmigo. A Silvi, por ser una persona tan encantadora. A David y Murielle, porque me encantan. A Yolanda, a Mayra y a Andrea, porque cada salida con ellas es una aventura. A Miguel Ángel, por ser tan increíble, por andar lo que le ha tocado andar siempre con la cabeza alta, dando ejemplo a todos y en especial a mí, por sujetarme, apoyarme y por estar siempre ahí, ¡gracias!.

AGRADECIMIENTOS

Una mención especial para mi Elena, mi compañera, mi amiga, mi hermana. Por dejarme vivir con ella, por venir cuando la necesito desde dónde sea y a la hora que sea, por abrazarme aunque yo no quiera, por ser tan maravillosamente diferente, por contestarle a la vida, por no rendirse y luchar por lo que uno quiere. Gracias.

En último lugar, a mi Juan Carlos, por quererme como soy, por ser un padre tan maravilloso, por ser un compañero tan generoso, por sonreírme cada vez que me ve, por compartir su vida conmigo, por hacerme tan increíblemente feliz, por existir, GRACIAS.



INDICE GENERAL

Abreviaturas	7
Índice de tablas	9
Índice de figuras.....	9

INTRODUCCIÓN 15

1. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO 15

1.1. El glucógeno	15
1.2. Degradación del glucógeno.....	16
1.3. Síntesis del glucógeno	17
1.4. Regulación de síntesis y degradación del glucógeno	18
1.5. Fisiopatologías del metabolismo del glucógeno	22
1.5.1. Glucogenosis hepáticas.....	25
1.5.2. Glucogenosis musculares.....	25

2. CATABOLISMO DEL GLUCÓGENO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO 31

2.1. Estructura tisular, celular y molecular del músculo esquelético.....	31
2.2. Tipos de fibras musculares.....	33
2.3. Ultraestructura de la fibra muscular esquelética.....	35
2.4. Mecanismo de la contracción muscular	39
2.4.1. La Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico	41
2.4.2. Tipos de contracción muscular.....	43
2.5. Energética de la contracción muscular	43

3. ENFERMEDAD DE McARDLE 44

3.1. Glucógeno fosforilasa muscular o miofosforilasa	44
3.1.1. Regulación de la GP	44

3.1.2. Dominios estructurales y centros de unión de la GP	48
3.1.3. Piridoxal Fosfato: Coactivador esencial de la GP	49
3.2. Deficiencia de la miofosforilasa	50
3.2.1. Sintomatología	50
3.2.2. El fenómeno de “ <i>second wind</i> ”	51
3.2.3. Formas clínicas atípicas de la enfermedad	51
3.3. Características	51
3.3.1. Histología	51
3.3.2. Bioquímica.....	52
3.4. Genética molecular	53
3.4.1. El gen <i>PYGM</i>	53
3.4.2. Mutaciones	54
3.4.3. Estudios transcriptómicos.....	60
3.4.4. Tratamiento de la enfermedad de McArdle	67
OBJETIVOS.....	73
MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
1. SUJETOS.....	77
1.1. Controles.....	77
1.2. Pacientes.....	77
2. MUESTRAS DE TRABAJO	78
2.1. Muestra primaria.....	78
2.1.1. Sangre total	78
2.1.2. Músculo esquelético.....	78
2.2. Muestra de trabajo.....	78
2.2.1. ADN Genómico (ADNg)	78
2.2.2. ARN Total	79
3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GPM O MIOFOSFORILASA	81
3.1. Fundamento.....	81
3.2. Descripción.....	81
4. CRIBADO MUTACIONAL DEL GEN <i>PYGM</i>.....	82
4.1. Mutación p.R50X	82
4.2. Mutación p.W798R.....	83

4.3. Mutación p.G205S	84
4.4. Estudio de nuevas mutaciones.....	84
5. SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL GEN <i>PYGM</i>.....	85
5.1. Etapa de amplificación.....	85
5.1.1. PCR Larga (“Long Range” PCR)	87
5.2. Etapa de purificación	88
5.3. Etapa de secuenciación	88
5.4. Etapa de análisis	88
6. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL GEN <i>PYGM</i>	89
6.1. ADNc total	89
6.2. Cuantificación del ARNm	89
6.3. Amplificación del ADNc	90
6.4. Secuenciación del ADNc	90
7. CLONAJE.....	92
7.1. Etapa de ligación	92
7.2. Etapa de transformación	92
7.3. Etapa de selección	93
7.4. Etapa de purificación	93
7.5. Etapa de amplificación y secuenciación	94
8. ANÁLISIS DE POLISOMAS DE MIOBLASTOS.....	94
9. ANÁLISIS POR <i>INMUNOBLOTTING</i>	95
9.1. Extracción de proteína total procedente de músculo esquelético, células en cultivo y sangre total.....	95
9.1.1. Músculo esquelético.....	95
9.1.2. Células en Cultivo: Mioblastos	96
9.1.3. Sangre total	96
9.2. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (<i>western blot</i>).....	96
10. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	97
10.1. Rehidratación	98
10.2. Primera dimensión: isoelectroenfoque	98
10.3. Equilibrado	99
10.4. Segunda dimensión: PAGE-SDS.....	99
11. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN CONDICIONES NATIVAS (<i>BLUE NATIVE</i>).....	99
11.1. Electroforesis en primera dimensión (1D)	100

11.2. Electroforesis en segunda dimensión (2D)	100
12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	100
RESULTADOS.....	103
1. CRIBADO MUTACIONAL Y SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>PYGM</i>	103
2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS VARIANTES PATOGENICAS EN EL GEN <i>PYGM</i>.....	105
3. PCR ILEGITIMA DEL GEN <i>PYGM</i>	112
3.1. Estudio de la PCR ilegítima del gen <i>PYGM</i> en sangre periférica	112
3.1.1. Amplificación y secuenciación del ADNc.....	112
3.1.2. Cuantificación relativa de los mensajeros mediante PCR a tiempo real.....	115
3.1.3. Identificación y caracterización de una nueva variante patogénica en el gen <i>PYGM</i> utilizando ARNm procedente de sangre periférica	116
3.1.4. Identificación del subtipo de célula sanguínea procedente de la PBMC en la cual se expresan los transcritos del gen <i>PYGM</i>	117
3.2. Estudio de la PCR ilegítima del gen <i>PYGM</i> en fibroblastos	117
3.3. Expresión de la Glucógeno Fosforilasa Muscular en diferentes tejidos	118
4. ESTUDIO DE LA GP MUSCULAR EN PACIENTES CON McARDLE.....	119
5. ANÁLISIS DEL PERFIL POLISOMAL EN MIOBLASTOS DE PACIENTES CON McARDLE	120
6. CARACTERIZACION DE LAS ALTERACIONES PROTEICAS EN LA ENFERMEDAD DE McARDLE.....	122
6.1. Análisis monodimensional	122
6.2. Análisis bidimensional	123
6.2.1. Deficiencia de las isoformas de GP muscular en los pacientes	123
6.2.2. Análisis de la expresión molecular en músculo esquelético adulto mediante PAGE-2D.....	125
6.2.3. Análisis de la expresión de Glucógeno Sintasa	125
6.2.4. Análisis de la expresión de SERCA1 en músculo esquelético adulto	126
6.3. Análisis bidimensional en condiciones nativas: colocalizaciones.....	127
DISCUSIÓN	133
CONCLUSIONES.....	159
BIBLIOGRAFIA.....	163
ARTÍCULOS	187

ABREVIATURAS

ACACB: Gen de la acetil-coenzima A carboxilasa 2	EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético
ACE: Gen de la enzima convertidor de angiotensina	EJC: <i>Exon junction complex</i>
ACC: Acetil coenzima A	ESEs: <i>Exonic splicing enhancer</i>
ACH: Acetil-colina	ESSs: <i>Exonic splicing silencer</i>
ACNT3: Gen de la α -actinina-3	F-1,6-Pasa: Fructosa-1,6-fosfatasa
ADN: Acido desoxirribonucleico	FAS: Sintasa de ácidos grasos
ADNc: DNA complementario	FC: Fosfocreatina
ADP: Adenosín difosfato	FT: Fibras de contracción rápida, del inglés “fast-twitch”
AGL: Ácidos grasos libres	G-1-P: Glucosa-1-fosfato
AK: Adenilato quinasa	G-6-P: Glucosa-6-fosfato
ALT: Transaminasa glutámico-pirúvica, también denominada GPT	G-6-Pasa: Glucosa-6-fosfatasa
ALDOA: Aldolasa A	GK: Glucoquinasa
AMOs: Oligonucleótidos antisentido tipo morfolino	GLUT2: Transportador de glucosa 2
AMP: Adenosín monofosfato	GLUT4: Transportador de glucosa 4
AMPC: AMP cíclico	GP: Glucógeno fosforilasa
AMPD1: Gen mioadenilato desaminasa	GPB: Glucógeno fosforilasa cerebral
AD: Herencia autosómica dominante	GPL: Glucógeno fosforilasa hepática
AR: Herencia autosómica recesiva	GPM: Glucógeno fosforilasa muscular
ARN: Acido ribonucleico	GS: Glucógeno sintasa
AST: Transaminasa glutámico-oxalacética, también denominada GOT	GSD: Glucogenosis
ATP: Adenosín trifosfato	GTP: Guanosín trifosfato
ATP2A1: Gen de SERCA1	GYSL1: Gen de la glucógeno sintasa muscular
BN: <i>Blue Native</i>	HNF: Factor nuclear hepático
BSA: Albúmina bovina sérica	HO: Homocigoto
β-GAL: Gen de la β -galactosidasa	HT: Heterocigoto
CADH15: Gen de la caderina 15	IC: Intervalo de confianza
CAPN3: Gen de la calpaína-3	IE: Intolerancia al ejercicio
CHAPS: 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato	IEF: Isoelectroenfoque
CK: Creatín quinasa	ISEs: <i>Intron splicing enhancer</i>
CKM: Creatín quinasa muscular	ISSs: <i>Intron splicing silencer</i>
CM: Control de músculo	IMP: Inosín monofosfato
CS: Control de sangre	Kb: Kilo base
CoA: Coenzima A	LAMP-2: Proteína 2 de la membrana lisosomal
CPT: Carnitina palmitoil transferasa	LDH: Lactato deshidrogenasa
Cr: Creatina	LDL: lipoproteína de baja densidad
Da: Daltons	LGMD: Distrofia muscular de cintura
DHPR: Receptor de dihidropiridina	MADA: Mioadenilato desaminasa
DMB: Distrofia muscular de Becker	MPL: Miofosforilasa
DMD: Distrofia muscular de Duchenne	MRS-P31: Espectroscopia por resonancia magnética de fosforo
DMSO: dimetilsulfóxido	NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
DTT: ditiotreitól	NADH-TR: Nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolio-reductasa
ECA: Enzima convertidora de angiotensina	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
	NMD: <i>Nonsense mediated decay</i>

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*
PAEI: Prueba anaeróbica de ejercicio en isquemia
PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAS: Tinción Ácido peryódico de Schiff
Pb: Pares de bases
PBGD: Gen de la porfobilinógeno desaminasa
PBMC: Fracción de células mononucleadas de sangre periférica
PBS: Tampón fosfato salino
PC: Piruvato Carboxilasa
PCR-RFLP: Reacción en cadena de polimerasa y Polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción
PDK4: Piruvato deshidrogenasa quinasa 4
PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK: Fosfofructoquinasa
PGC1: Coactivador 1 del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas
PGM: Fosfoglicerato mutasa
Pi: Fosforo Inorgánico
pI: Punto isoeléctrico
PK: Fosforilasa quinasa
PKA: proteína quinasa A
PLP: Piridoxal fosfato
PPARGC1A: Coactivador-1 α del PPAR γ
PPi: Pirofosfato
PP1A: gen de la ciclofilina A
PTC: Codón prematuro de terminación
PVDF: difluoruro de polivinildeno
PYGB: Gen de la isoforma cerebral de la glucógeno fosforilasa
PYGL: Gen de la isoforma hepática de la glucógeno fosforilasa
PYGM: Gen de la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa
RMN-P31: Resonancia magnética de fosforo
RS: Retículo sarcoplasmático
RT: Retrotranscripción
RyR: Canal de rianodina
SDH: Succinato deshidrogenasa
SDS: Dodecilsulfato de sodio
SERCA1: Ca²⁺ ATPasa del Retículo sarco(endo)plasmático
SRA: Sistema renina angiotensina
SREBP: Proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides
ST: Fibras de contracción lenta, del inglés "slow-twitch"

TBS: Tampón Tris Base salino
TE: Tris-EDTA
UDP: Uridina difosfato
UDPG: Uridina Difosfoglucosa
UTP: Uridina trifosfato
VGs: Variantes genómicas
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad
VLCAD: déficit de deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena muy larga
VO2max: Consumo máximo de oxígeno
VO2pico: Consumo de oxígeno pico
VT: Umbral ventilatorio
WT: *Wild type*
 ΔG : Energía libre de Gibbs

TABLAS

Tabla I: Clasificación de las glucogenosis.....	24
Tabla II: Proteínas del sarcómero.....	38
Tabla III: Mutaciones en el gen <i>PYGM</i>	55
Tabla IV: Estudio de nuevas mutaciones mediante PCR-RFLP	85
Tabla V: Cebadores utilizados para la amplificación del gen <i>PYGM</i>	86
Tabla VI: Cebadores utilizados para el mapeo de la delección del exón 17	87
Tabla VII: Cebadores utilizados para la amplificación del ADNc del gen <i>PYGM</i>	91
Tabla VIII: Cebadores internos utilizados para la secuenciación del ADNc del gen <i>PYGM</i>	91
Tabla IX: Condiciones de la reacción de ligación.....	92
Tabla X: Cebadores utilizados para amplificación de los insertos del vector pGEM-T	94
Tabla XI: Anticuerpos empleados en la inmunodetección para el análisis por inmunoblot.....	97
Tabla XII: Mutaciones en el gen <i>PYGM</i> de los pacientes estudiados	104
Tabla XII: Mutaciones identificadas en el ADNg y en el ADNc obtenido de músculo de los pacientes estudiados	106
Tabla XIV: Mutaciones identificadas en el ADNc obtenido a partir del ARNm de sangre total periférica en los pacientes estudiados.....	113
Tabla XV: Resultados obtenidos mediante la amplificación de los ADNc procedentes del ARN total de músculo y sangre periférica de pacientes y familiares	114
Tabla XVI: Mutaciones de los pacientes en los que se realizó la inmunodetección de la GPM o miofosforilasa	119
Tabla XVII: Escala de gravedad clínica de los pacientes con la enfermedad de McArdle	155

FIGURAS

Figura 1: Estructura del Glucógeno	15
Figura 2: Degradación del glucógeno para obtener glucosa.....	17
Figura 3: Síntesis del glucógeno	18
Figura 4: Regulación de la GP por modificación covalente	19
Figura 5: Acción de la adrenalina en el músculo esquelético	20
Figura 6: Regulación de la GS por modificación covalente	21
Figura 7: Regulación de la GS por modificación covalente mediada por epinefrina.....	22

Figura 8: Diagrama de los defectos enzimáticos que causan GSD	23
Figura 9: Estructura de la fibra muscular	33
Figura 10: Inmunohistoquímica de un corte muscular	34
Figura 11: Cortes histológicos de biopsia muscular.....	35
Figura 12: Organización sarcomérica de la fibra muscular	35
Figura 13: Organización de la fibra muscular	37
Figura 14: Esquema de las proteínas del sarcómero del músculo esquelético	39
Figura 15: La Ca^{2+} - ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico	42
Figura 16: Cambios conformacionales de la SERCA en el transporte de Ca^{2+}	42
Figura 17: Representación de la degradación del glucógeno	44
Figura 18: Regulación de la glucógeno fosforilasa	45
Figura 19: Mecanismo celular de activación de la degradación del glucógeno	46
Figura 20: Esquema de la doble regulación de la GPM	47
Figura 21: Estructura cristalina de la glucógeno fosforilasa a	47
Figura 22: Diagrama de cintas de una subunidad de la fosforilasa b	48
Figura 23: Estructura cristalina de la GP muscular de conejo	49
Figura 24: Mecanismo de reacción de GP.....	50
Figura 25: Curva del ácido láctico tras una PAEI	53
Figura 26: Cromosoma 11	54
Figura 27: Esquema para el diagnóstico en sangre de la enfermedad de McArdle	59
Figura 28: Esquema de actuación del mecanismo NMD	61
Figura 29: Papel de las proteínas SR y hnRNP en la selección del sitio de <i>splicing</i>	62
Figura 30: Representación esquemática de las secuencias, proteínas y factores que intervienen en el proceso de <i>splicing</i>	63
Figura 31: Motivos de unión para las proteínas SR SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55	63
Figura 32: Aislamiento de monocitos mediante el sistema MACS.....	80
Figura 33: Método de determinación de GPM.....	82
Figura 34: Fragmentos de restricción obtenidos con Nla III en el análisis de la mutación p.R50X en el gen <i>PYGM</i>	83
Figura 35: Fragmentos de restricción obtenidos con Nla III en el análisis de la mutación p.W798R en el gen <i>PYGM</i>	84
Figura 36: Fragmentos de restricción obtenidos con Nla III en el análisis de la mutación p.G205S en el gen <i>PYGM</i>	84
Figura 37: Esquema del vector pGEM-T (promega).....	92
Figura 38: Esquema de la purificación de plásmidos (promega).....	94

Figura 39: Esquema de electroforesis bidimensional	97
Figura 40: Frecuencias alélicas de las tres mutaciones más frecuentes en la serie de 42 pacientes estudiados	103
Figura 41: Digestión correspondiente a la PCR-RFLP del exón 5 del paciente con Bsu36I	105
Figura 42: Electroferogramas del paciente 1	106
Figura 43: Electroferograma del estudio del ADNc del paciente 2, exón 17	107
Figura 44: Electroforesis de la PCR larga en ADNg del paciente 2	107
Figura 45: Esquema de la delección de 1094pb en el paciente 2	108
Figura 46: Electroferograma del ADNg mostrando la mutación c.645G>A en heterocigosis en el exón 5 del gen <i>PYGM</i> del paciente 3	108
Figura 47: Estructura secundaria del ARN predicha para el ARNm del gen <i>PYGM</i>	109
Figura 48: Electroferograma de la secuenciación de la mutación c.2310_2311dupCC en estado de homocigosis en ADNg.....	110
Figura 49: Digestión correspondiente a la PCR del exón 18	110
Figura 50: Electroferograma de la secuenciación de la mutación c.1325T>A en estado de homocigosis en ADNg	111
Figura 51: Digestión correspondiente a la PCR del exón 11 del paciente 5.....	111
Figura 52: Electroferograma de la mutación c.407delG en heterocigosis en ADNg	112
Figura 53: Cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real del ADNc procedente del ARN total del gen <i>PYGM</i> extraído de pacientes con la enfermedad de McArdle a partir de músculo esquelético y de sangre periférica.....	115
Figura 54: Electroferograma del ADNc procedente del ARNm del gen <i>PYGM</i> mostrando la retención del intrón 6 como consecuencia del cambio c.645G>A	116
Figura 55: PCR del ADNc correspondientes a las dos subpoblaciones aisladas CD14+ y CD14-	117
Figura 56: PCR del fragmento 1 del gen <i>PYGM</i> amplificado a partir del ADNc obtenido a partir del ARN total de fibroblastos	118
Figura 57: Inmunoblot correspondiente a la GPM	118
Figura 58: Inmunoblot de GPM en músculo esquelético adulto	120
Figura 59: Perfiles de polisomas en gradientes continuos de sacarosa	121
Figura 60: Inmunoblot de los pacientes 16, 20, 22 y 23 para GPM, SERCA1 y GS.....	123
Figura 61: Cambios cualitativos en el mapa de expresión proteica de geles bidimensionales de la GPM.....	124
Figura 62: Inmunoblot 2D de GPM y GS	125
Figura 63: Inmunoblot 2D de GPM y SERCA1.....	126
Figura 64: Electroforesis <i>blue native</i> bidimensional.....	127
Figura 65: Análisis bidimensional de GS mediante la técnica del BN	129

Figura 66: Mecanismo de <i>splicing</i> alternativo propuesto para la inserción de 6pb como consecuencia de la mutación c.529-8G>A	135
Figura 67: Esquema de la delección de 1094pb en el gen <i>PYGM</i> en el paciente 2	137
Figura 68: Mecanismos de <i>splicing</i> propuesto para la variante sinónima p.K215K	139
Figura 69: Resultados teóricos obtenidos mediante el programa phosphosite para el análisis de GPM	150
Figura 70: Ciclo catalítico de SERCA1	151

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

1.1. EL GLUCÓGENO

El glucógeno es la forma principal de almacenaje de carbohidratos en los animales, se encuentra en proporción mayor en el hígado (hasta 6%) y en el músculo, donde rara vez excede de 1%. Sin embargo, debido a su mayor masa, el músculo almacena de tres a cuatro veces la cantidad de glucógeno que tiene el hígado como reserva.

En las células, el glucógeno aparece en forma de grandes gránulos citoplasmáticos de 100 a 400 Å de diámetro, que contienen hasta 120.000 unidades de glucosa, constituidos por agrupaciones de simples moléculas, muy ramificadas, por lo que tiene un peso molecular muy elevado. El glucógeno es un polisacárido de D-glucosa con enlaces α -1,4, sin embargo, está más ramificado, y su molécula es más compacta (1); las ramificaciones aparecen cada 8 a 12 residuos de glucosa (figura 1). Los gránulos de glucógeno también contienen las enzimas que catalizan la síntesis y la degradación del mismo, así como algunas otras enzimas reguladoras de estos productos.

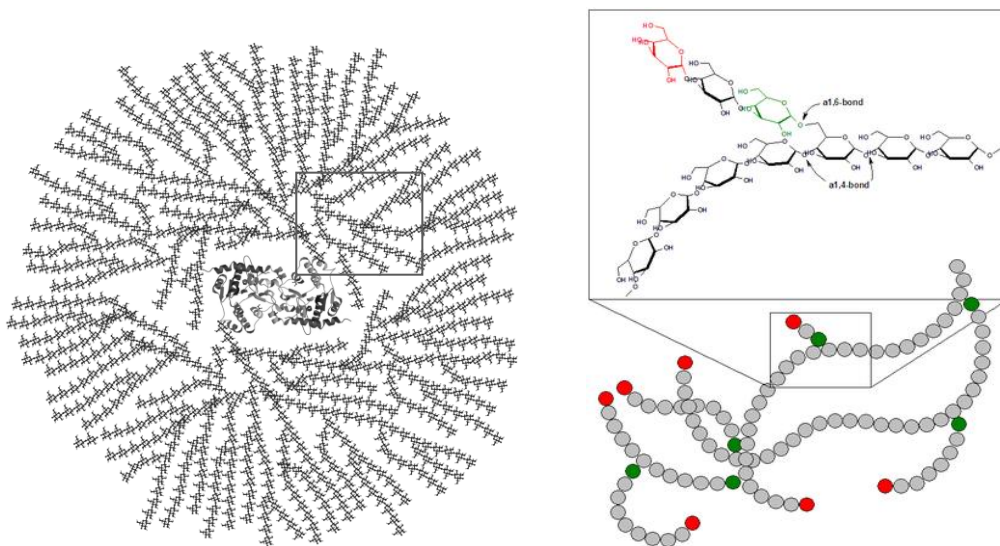


FIGURA 1. Estructura del glucógeno. <http://images.google.es/imgres?imgurl>

La función del glucógeno muscular es actuar como una fuente de fácil disponibilidad de unidades de hexosa para la glucólisis dentro del propio músculo. El glucógeno hepático sirve, en gran parte, para exportar unidades de hexosa para la conservación de la glucosa sanguínea, en particular entre comidas (2).

En todos los tejidos, la síntesis y degradación del glucógeno se produce por vías metabólicas diferentes, en las que, en último término, dos enzimas, la glucógeno sintasa (GS; *EC* 2.4.1.21) y glucógeno fosforilasa (GP; *EC* 2.4.1.1), actúan directamente en cada una de ellas. Sus actividades son reguladas, de una forma coordinada, en una cascada multicíclica por una serie de mecanismos en los que se incluyen la fosforilación y la modulación por efectores alostéricos.

1.2. DEGRADACIÓN DEL GLUCÓGENO O GLUCOGENOLISIS

El hígado y el músculo son los dos principales tejidos de almacenamiento de glucógeno. En el músculo, la demanda de ATP provoca la conversión del glucógeno en glucosa-6-fosfato (G-6-P) que entrará en al glucólisis. En el hígado, una concentración baja de glucosa en la sangre activa la degradación del glucógeno a G-6-P que, a su vez, es hidrolizada a glucosa y liberada al torrente sanguíneo para contrarrestar esta situación.

La degradación del glucógeno requiere la acción de tres enzimas:

1. La glucógeno fosforilasa (GP) cataliza la fosforólisis del glucógeno (ruptura de enlaces por sustitución con un grupo fosfato) para producir glucosa-1-fosfato (G-1-P) (figura 2). Este enzima solamente liberará una unidad de glucosa que se encuentre, por lo menos, a cinco unidades del punto de ramificación.
2. La enzima llamada "desramificante" (amilo- α -1,6-glucosidasa, *EC* 3.2.1.33). La enzima desramificante es una proteína bifuncional. Su actuación incluye dos pasos. En el primero transfiere tres restos de glucosa de una cadena lateral en degradación a una cadena central (actividad transferasa de glucano), dejando un único resto de glucosa unido a la cadena central por un enlace α -1,6. Éste es hidrolizado en un segundo paso a glucosa libre (actividad α -1,6-amilasa). La ramificación que ha quedado ahora expuesta puede ser atacada por la GP. Por consiguiente, el 90% de los restos de glucosa del glucógeno son convertidos a G-1-P. El 10% restante, los que se encuentran en los puntos de ramificación, son convertidos a glucosa.
3. La fosfoglucomutasa (*EC* 5.4.2.2) convierte la G-1-P a G-6-P (figura 2), la cual se forma también en el primer paso de la glucólisis por la acción de la hexoquinasa (*EC* 2.7.1.1) o de la glucoquinasa (*EC* 2.7.1.12). La G-6-P puede o bien continuar a la largo de la vía glucolítica (en el músculo), o bien ser hidrolizada a glucosa (en el hígado).

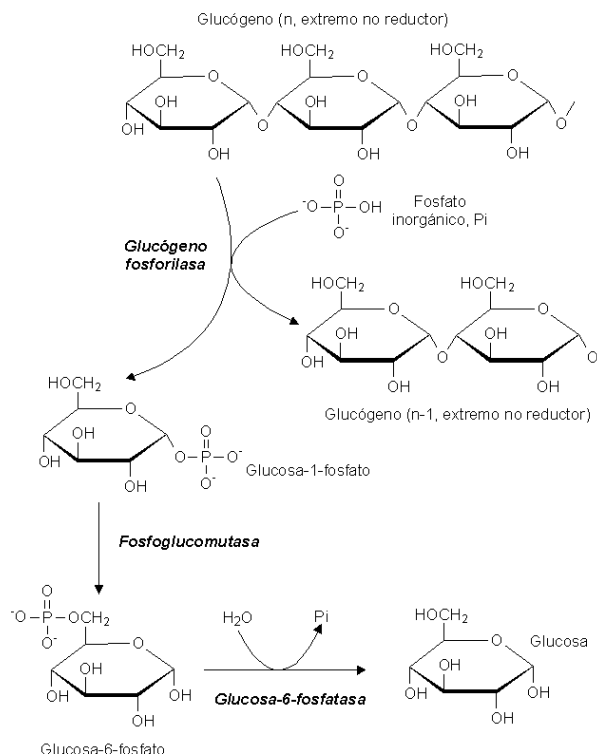


FIGURA 2. Degradación del glucógeno para obtener glucosa.
<http://campus.usal.es/~dbbm/clasmed/clasmed.html>

1.3. SÍNTESIS DEL GLUCÓGENO O GLUCOGENOGÉNESIS

La glucogenogénesis, también conocida como glucogénesis, es la vía por la que se sintetiza glucógeno a partir de glucosa (2). Esta reacción está catalizada por la glucógeno sintasa, GS. Debido a que la conversión directa de G-1-P a glucógeno y P_i es termodinámicamente desfavorable (ΔG positiva) a todas las concentraciones fisiológicas de P_i , la biosíntesis del glucógeno requiere un paso exergónico adicional (3). Éste se consigue combinando G-1-P con trifosfato de uridina (UTP) para formar difosfato de uridina-glucosa (UDP-glucosa). El estado de “alta energía” de la UDP-glucosa le permite dar espontáneamente unidades de glucosilo a la cadena de glucógeno en formación (figura 3).

La acción de la GS produce largas cadenas de amilasa las cuales son incompatibles con un buen funcionamiento celular. En este punto interviene la enzima ramificante (glucosil-4,6-transferasa) que cataliza la transferencia de una cadena de entre 5 y 9 residuos de glucosa a un punto que se halla, aproximadamente, entre 4 y 6 residuos de distancia de cualquier otra ramificación, formando un enlace α -1,6. Ya que este tipo de enlaces tienen menor energía libre que los enlaces α -1,4, el equilibrio de la reacción favorece la formación de ramificaciones, con un doble efecto: hacer a la

molécula de glucógeno más soluble y aumentar el número de puntos que permitan actuar a la glucógeno sintasa y a la glucógeno fosforilasa.

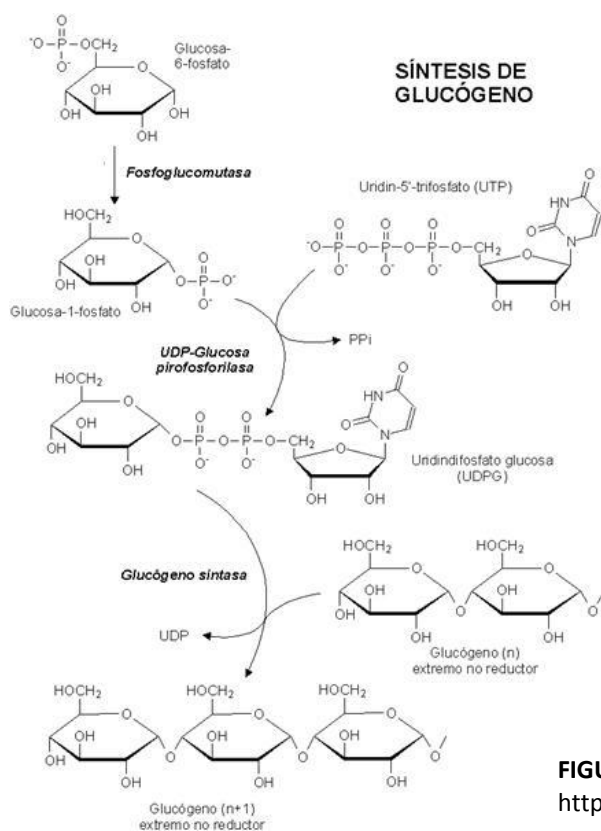


FIGURA 3. Síntesis del glucógeno.

<http://campus.usal.es/~dbbm/clasmed/clasmed.html>

1.4. REGULACIÓN DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO

Tanto la síntesis como la degradación del glucógeno son exergónicas en las mismas condiciones fisiológicas. No obstante, si ambas vías funcionaran simultáneamente, lo que ocurriría sería la pérdida energética constante por la hidrólisis del UTP. Por tanto, GP y GS deben estar bajo un control estricto, de tal manera que el glucógeno sea sintetizado o utilizado según las necesidades celulares. El mecanismo de este control conlleva no solamente la regulación alostérica sino también la modificación covalente, catalizada enzimáticamente, de ambas proteínas, GP y GS. Las mismas reacciones de modificación covalente están, en último término, bajo control hormonal mediante una cascada enzimática. En el hígado, el metabolismo del glucógeno es controlado en último término por la hormona glucagón, y en el músculo y otros tejidos, el control es ejercido por las hormonas adrenalina y noradrenalina (4).

La regulación de la degradación de glucógeno se ejerce a nivel de la glucógeno fosforilasa. La GP se encuentra regulada mediante dos mecanismos:

- I. Regulación alostérica por metabolitos (5): en músculo el AMP y en hígado la glucosa. El AMP es un efector alostérico positivo o activador de la fosforilasa de músculo, se une a la fosforilasa b y la activa, actuando así cuando el estado energético del músculo es bajo. El ATP puede revertir este efecto activador (figura 4). La elevada concentración de glucosa en sangre desconecta o desactiva la degradación del glucógeno en hígado.

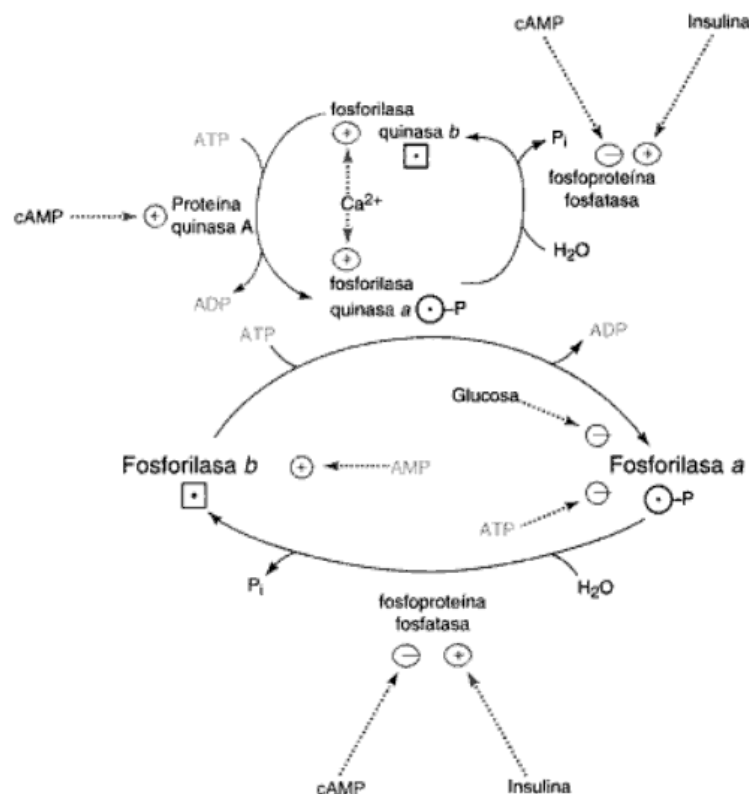


FIGURA 4. Regulación de la GP por modificación covalente. La fosforilación convierte a la forma inactiva (b) en la forma activa (a). Existen dos formas de la enzima que degrada el glucógeno, glucógeno fosforilasa a (fosforilada y activa) y fosforilasa b (defosforilada e inactiva). La fosforilación en un resto de serina de cada subunidad de la fosforilasa b hace que se convierta en la fosforilasa a, y esa fosforilación la cataliza la fosforilasa b quinasa. La fosforilasa b quinasa se activa a su vez, por fosforilación y también por alto nivel de Ca^{2+} en músculo. La enzima que cataliza esta última fosforilación, de la fosforilasa b quinasa, es la proteína quinasa, que a su vez se activa por la unión del AMPc. http://eglobalmed.com/core/Biochemistry_Kings/web.indstate.edu/thcme/mwking/glycogen.html

- II. Modificación covalente reversible por fosforilación/desfosforilación como respuesta a la acción hormonal. La adrenalina y el glucagón, activan la degradación de glucógeno, en el músculo (figura 5), y el glucagón en el hígado.

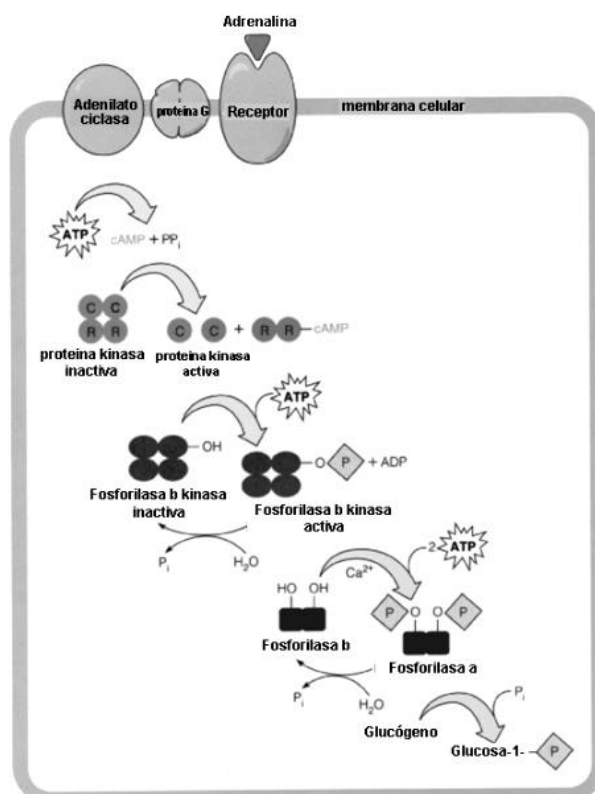


FIGURA 5. Acción de la adrenalina en el músculo esquelético: activación de la degradación de glucógeno. <http://drleiva1p.files.wordpress.com/2008/05/5-regulacion-glucogeno.pdf>

La síntesis de glucógeno, se encuentra a su vez regulada por la acción de la glucógeno sintasa. La actividad de la enzima glucógeno sintasa es regulada por modificación covalente (fosforilación/desfosforilación) en respuesta a la acción hormonal (adrenalina en músculo y glucagón en hígado), y por efectores alostéricos que la inhiben fuertemente a concentraciones fisiológicas como el ATP, ADP y el P_i, aunque esta inhibición puede ser contrarrestada por acción de la G-6-P, a concentraciones mayores a las fisiológicas.

La GS parece encontrarse en forma de homotetramero, aunque algunos autores señalan que se encuentra en forma de homodímero (6, 7). Existen dos isoformas, la hepática y la muscular, con un 46% de homología entre ambas. El gen que codifica para la isoforma del hígado, *GYS2*, se encuentra localizado en el cromosoma 12p12.2. La isoforma muscular, tanto de músculo cardíaco como esquelético, es codificada por el gen *GYS1*, localizado en el cromosoma 19q13.3 y que codifica para una proteína de 737 aminoácidos, GS.

La actividad de la GS está regulada por la fosforilación de los residuos de serina en cada subunidad. La glucógeno sintasa *a* (activa) es inactivada por fosforilación a glucógeno sintasa *b* (inactiva) (7). La forma inactiva es dependiente de la concentración de G-6-P. Existen numerosas quinasas implicadas en la regulación de la fosforilación, tanto de la forma hepática como de la forma muscular de GS. Hoy en día,

se conocen 7 proteínas quinasas que desactivan, al menos parcialmente, la GS de músculo humano, desfosforilandola en 1 o más de 9 residuos de serina presentes en sus subunidades.

Las 7 quinasas que regulan la actividad de la GS son la PKA, PKC, glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), la glucógeno sintasa quinasa fosforilasa (comúnmente llamada fosforilasa quinasa, proteína calmodulina dependiente de quinasa II (CaMPK-II), la caseína quinasa, y la caseína quinasa II (figura 6). Los primeros eventos de la fosforilación son iniciados por la fosforilasa quinasa, PKA, PKC, CaMPK-II, y CK-II. Cuando, por ejemplo, el glucagón se une a su receptor en las células hepáticas, se produce la activación de PKA lo que conduce, mediante una cascada de reacciones, a la fosforilación de GS; paralelamente a PKA, se activan la fosforilasa quinasa y la caseína quinasa II. Por lo tanto, el efecto neto de la acción de glucagón en hepatocitos es la activación de tres quinasas que fosforilan e inhiben la GS.

Como la insulina y el glucagón son hormonas de contrarregulación ejercen efectos opuestos sobre el tipo y el nivel fosforilación de GS. Como se describió anteriormente, cuando el glucagón se une a su receptor en hepatocitos se produce un aumento en la actividad de PKA. PKA puede fosforilar a GS, por lo menos, en cuatro lugares diferentes. La insulina ejerce un efecto negativo sobre la actividad de GSK-3 reduciéndose el nivel de fosforilación de GS (8).

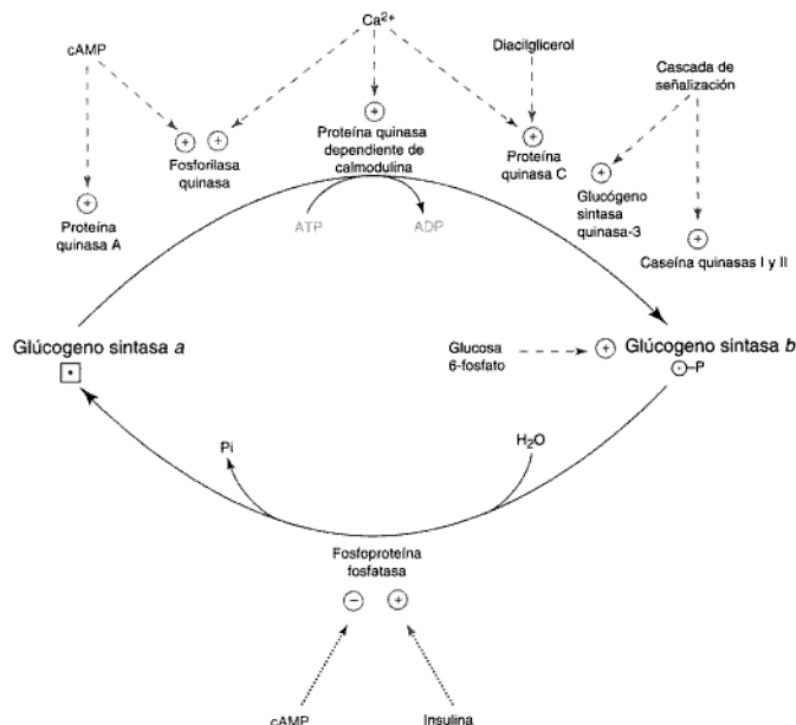


FIGURA 6. Regulación de la GS por modificación covalente. La fosforilación convierte a la forma activa (a) en inactiva (b).

http://eglobalmed.com/core/Biochemistry_Kings/web.indstate.edu/thcme/mwking/glycogen.html

El aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular también afectan la actividad de GS, inhibiéndola, ya que producen la activación de la proteína quinasa dependiente de calmodulina lo que conduce a la fosforilación de GS. Por ejemplo, la activación de los receptores α -adrenérgicos del músculo esquelético produce la activación de la fosfolipasa C, PLC- γ , lo que conduce a aumentar los niveles de IP_3 y DAG, aumentando la liberación del Ca^{2+} almacenado con la consiguiente disminución de la actividad de GS (figura 7).

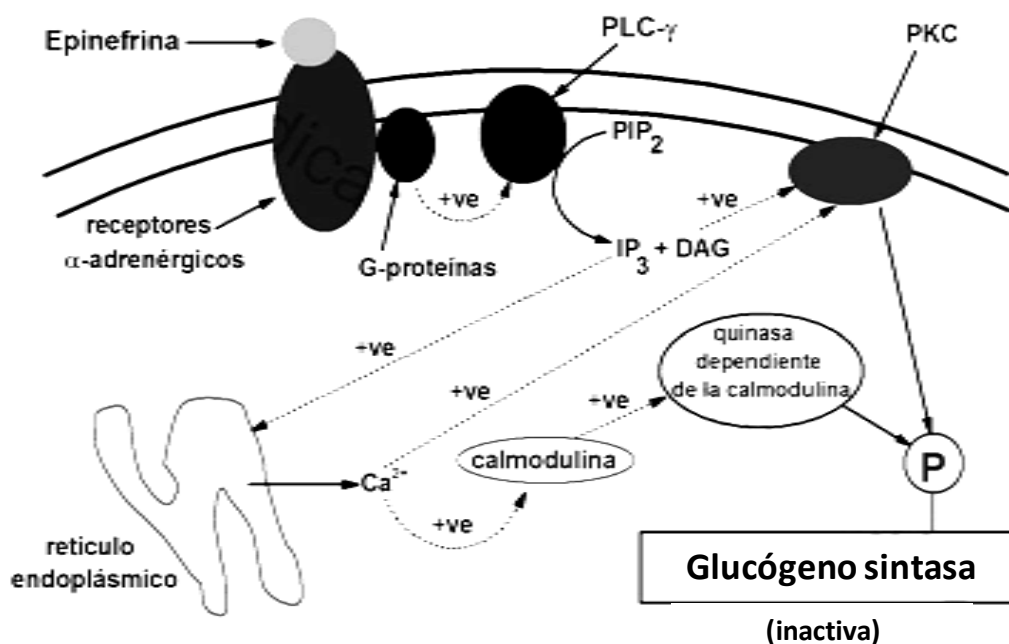


FIGURA 7. Regulación de la GS por modificación covalente mediada por epinefrina. Vías involucradas en la regulación de GS por la activación de los receptores α -adrenérgicos por la epinefrina. PKC: proteína quinasa C. PLC- γ : fosfolipasa C- γ . PIP_2 : fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2). IP_3 : inositol trifosfato. DAG: diacilglicerol. "+ve": efecto positivo. La fosforilación convierte a la forma activa (a) en inactiva (b). <http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/glycogen-sp.html>

1.5. FISIOPATOLOGÍAS DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

Durante las últimas décadas se han descrito prácticamente todas las enzimas que participan tanto en la síntesis como en la degradación del glucógeno (figura 8). Por lo tanto, se incluyen bajo esta definición los trastornos genéticos que afectan a la vía de formación del glucógeno y las de su utilización. Los defectos genéticos de estas proteínas originan, no sólo un amplio abanico de enfermedades caracterizadas por la acumulación de glucógeno, de estructura normal o anormal, en las células de distintos tejidos sino también una gran heterogeneidad clínica y genética.

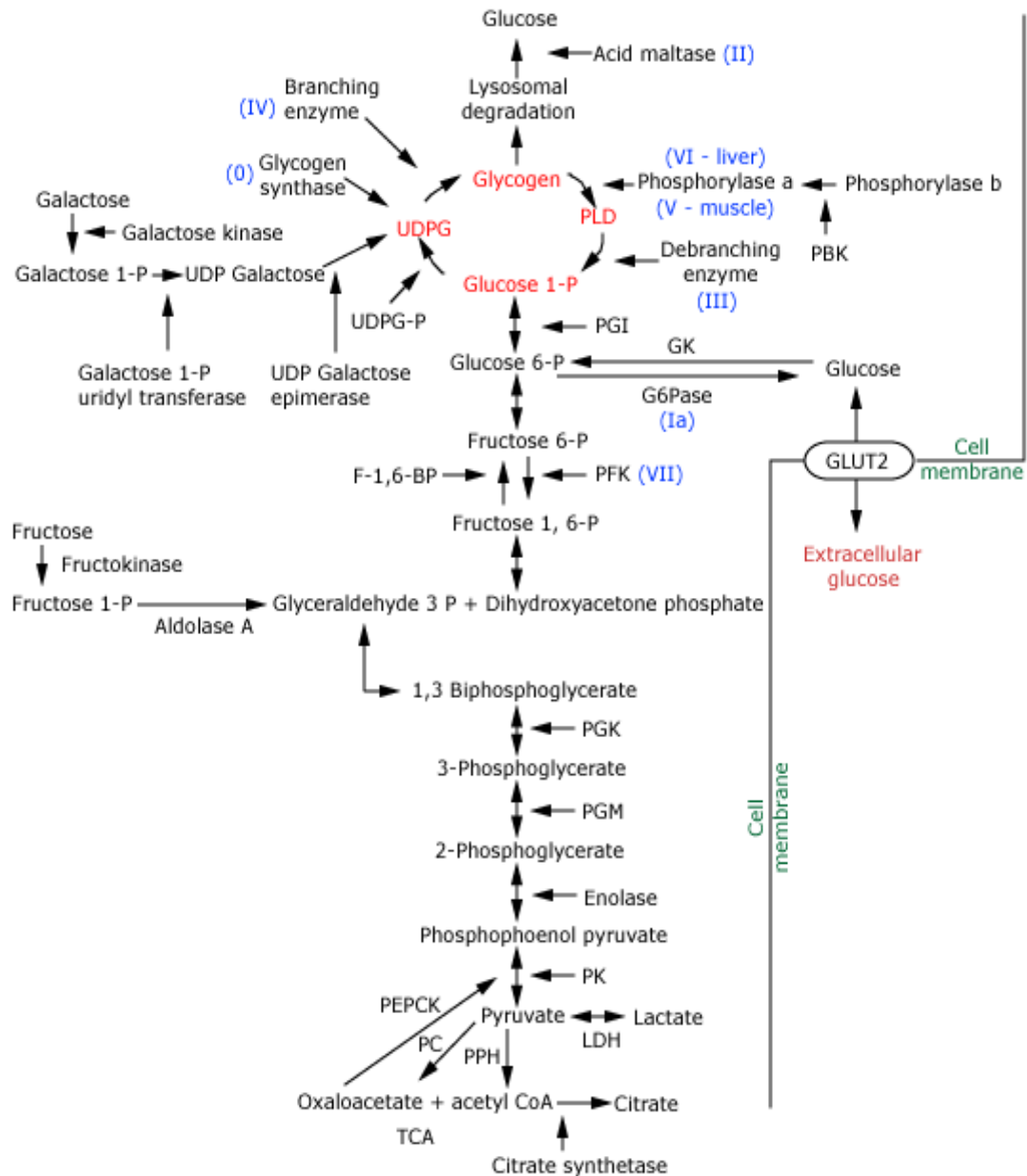


FIGURA 8. Diagrama de los defectos enzimáticos que dan como resultado los diferentes tipos de glucogenosis (se indican en números romanos). (0): glucógeno sintasa, (Ia): glucosa 6-fosfatasa (G6Pase); (II): maltasa ácida; (III): enzima desramificante; (IV): enzima ramificante; (V): GP muscular; (VI): GP hepática, (VII): fosfofructoquinasa (PFK). Abreviaturas: PBK: fosforilasa b quinasa; UDPG-P: uridina difosfato glucosa fosforilasa; IGP: fosfoglucosa isomerasa; GK: glucoquinasa, F-1,6-BP: fructosa-1,6-bisfosfatasa; PGK: fosfoglicerato quinasa; PGM: fosfoglicerato mutasa; PK: piruvato quinasa; LDH: lactato deshidrogenasa; ALDOA: aldolasa A; UDPG: uridina difosfato glucosa; PLD: dextrina límite fosforilasa; GLUT2: transportador de glucosa 2; PEPCK: fosfoenol piruvato carboxiquinasa; PC: piruvato carboxilasa; PDH: piruvato deshidrogenasa. <http://medicina.ufm.edu/cms/es/Enfermedad-de-Tauri>.

La estimación de la prevalencia de las glucogenosis, GSD, en su conjunto es de 1:20.000-1:25.000. Las formas más frecuentes, el 90% del total, son las llamadas tipo I, II, III y VI. Las glucogenosis musculares normalmente están subdiagnosticadas (9) y son de herencia autosómica recesiva, con excepción de la deficiencia de fosforilasa quinasa y de algunos defectos de la glucólisis terminal, relacionados con el cromosoma X.

TIPO	DEFICIT ENZIMÁTICO	OTROS NOMBRES	LOCALIZACIÓN GENÉTICA	OTROS TEJIDOS AFECTADOS
Glucogenosis hepáticas				
<i>0</i>	Glucógeno sintasa		12p.12.2	
<i>Ia</i>	Glucosa-6-fosfatasa	Von Gierke	Cr. 17	Riñón
<i>Ib</i>	Translocasa-glucosa-6-fosfato			Neutrófilos
<i>Iasp</i>	Proteína estabilizadora			
<i>Ic</i>	Transportador de fosfato			
<i>Id</i>	Transportador de glucosa			
<i>III</i>	Amilo-1,6-glucosidasa	Enfermedad de Forbes-Cori	1p21	Músculo y corazón
<i>IV</i>	α -1,4-1,6-transglucosidasa		3p12	Multisistémica
<i>VI</i>	GP hepática	Enfermedad de Hers	14q21-q22	
<i>IX</i>	Fosforilasa-b-quinasa		Ligada al X	
<i>XI</i>	Deficiencia de GLUT2	Síndrome de Fanconi-bickel	3q26.1q26.3	Riñón
Glucogenosis musculares				
<i>VII</i>	Fosfofructoquinasa	Enfermedad de Tauri	1q32	Eritrocitos
<i>V</i>	GP muscular	Enfermedad de McArdle	11q13	
<i>Glucogenosis distales</i>				
Deficiencias generalizadas				
<i>II</i>	α -1,4-glucosidasa ó Maltasa ácida	Enfermedad de Pompe	17(q25.2-q25)	Miocardio, SNC, Leucocitos, Hígado, Riñón
<i>IIb</i>	proteína-2 de la membrana lisosomal	Enfermedad de Danon	Ligada al X	Multisistémica

TABLA I. Clasificación de las glucogenosis en función del órgano predominantemente afectado.

Por tratarse de los órganos con mayor contenido en glucógeno, el hígado y el músculo se ven afectados con mayor frecuencia y severidad en estos trastornos del metabolismo, pero otros órganos pueden también estar afectados. Por tanto, la clasificación más extendida de las glucogenosis se basa en si el órgano predominantemente alterado es el músculo o el hígado (tabla I). Así pues, las llamadas glucogenosis hepáticas incluyen a la tipo Ia (von Gierke), Ib, Iasp, Ic, Id, tipo II (Pompe), tipo III, tipo IV (Andersen), tipo VI (Hers), tipo IX, déficit de GS y déficit del transportador 2 de la glucosa (síndrome de Fanconi-Bickel); mientras que las glucogenosis musculares son la tipo V (McArdle), VII (Tarui) y los déficits de fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa y lactato deshidrogenasa.

1.5.1. GLUCOGENOSIS HEPÁTICAS

Las GSD hepáticas comprenden la GSD I, las formas de presentación hepáticas de la III, IV, VI, y IX y la GSD 0. La forma de presentación de la I, III, VI y IX es similar durante el período de lactante, con hipoglucemia, marcada hepatomegalia y fallo de crecimiento. La I es la más grave puesto que no sólo implica un problema en la glucogenólisis sino también en la gluconeogénesis.

1.5.2. GLUCOGENOSIS MUSCULARES

Se dividen en dos grandes grupos, según cursen con debilidad muscular o con intolerancia al ejercicio (10).

1.5.2.1. Glucogenosis que cursan con debilidad muscular

La glucogenosis tipo II o déficit de maltasa ácida (enfermedad de Pompe), la glucogenosis tipo IIb o pseudo- Pompe, la glucogenosis tipo III, y la glucogenosis tipo IV (enfermedad de Andersen) se incluyen aquí como glucogenosis musculares porque aunque el hígado es el principal órgano afectado existen fenotipos que cursan con afectación muscular.

Glucogenosis tipo II o enfermedad de Pompe

La deficiencia de la α -glucosidasa lisosomal (maltasa ácida) está presente en todas las células (11). Existen tres fenotipos clínicos: infantil, juvenil y adulto, con distintas formas de transmisión.

Infantil clásica o enfermedad de Pompe: más severa con inicio en las primeras semanas o meses de vida, o incluso al nacer, con dificultades alimentarias y fallo en el crecimiento. La cianosis y las crisis de disnea son precoces con progresión rápida hacia la insuficiencia cardíaca intratable y muerte por insuficiencia cardíaca congestiva en el

primer año o antes de los 2 años de vida. La hepatomegalia no se debe al almacenamiento del glucógeno sino a la insuficiencia cardíaca. Puede ocurrir, con poca frecuencia, la enfermedad muscular predominante sin enfermedad cardíaca, en lactantes, con evolución más lenta y muerte más tardía (12).

Juvenil: Retaso de las adquisiciones motoras, hipotonía y debilidad muscular de la cintura y tronco sin cardiomiopatía evidente. La pseudohipertrofia gemelar es muy común y similar a la distrofia muscular de Duchenne. La muerte ocurre por fallo respiratorio, en la 2ª o 3ª década de la vida.

Adulta: Se inicia entre la segunda y la cuarta década de la vida, con debilidad muscular, miopatía lentamente progresiva, ligera o ausente alteración cardíaca y muerte por fallo respiratorio. Las dificultades de marcha y respiratorias ocurren debido a alteraciones de los músculos de la cintura pélvica, espinales y diafragma. Se puede confundir con poliomiositis o distrofia muscular de cinturas (13).

La heterogeneidad clínica se debe al gran número de mutaciones; la diversidad alélica explica la heterogeneidad intrafamiliar. El gen que codifica para la maltasa ácida se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 17. La enzima en condiciones normales puede degradar completamente el glucógeno; su deficiencia provoca una acumulación progresiva de glucógeno en los lisosomas; existe una correlación inversa entre la severidad clínica y el nivel de actividad residual que hay en las formas juveniles y adulta, y totalmente ausente en la infantil (13). El metabolismo intermediario no está afectado: no hay hipoglucemia, el ácido úrico y los lípidos son normales. En la forma infantil la acumulación del glucógeno es severa en todos los tejidos particularmente en el músculo esquelético y en el cardíaco; pero, aparte de en el músculo, en los otros fenotipos no hay un aumento del glucógeno, especialmente en el fenotipo adulto. Actualmente, se está utilizando terapia enzimática sustitutiva como tratamiento en algunos enfermos (14).

Glucogenosis tipo IIb o pseudo- Pompe. Enfermedad de Danon

La enfermedad de Danon o Glucogenosis lisosomal maltasa ácida normal, es una enfermedad multisistémica con un pronóstico fatal, incluso en mujeres portadoras (15). Presenta miocardiopatía, miopatía y retraso mental (16) y otras manifestaciones como elevación persistente de CK, ALT, AST y LDH (16) así como afectación oftalmológica. Se transmite de forma dominante ligada al cromosoma X (16), basándose el diagnóstico definitivo en la demostración del déficit de la proteína-2 de la membrana lisosomal (LAMP-2) que conlleva un acúmulo de glucógeno lisosomal en el músculo cardíaco y esquelético. La afectación cardíaca es la más frecuente y el factor pronóstico más importante, siendo las principales causas de muerte la insuficiencia cardíaca o la muerte súbita (3), antes de los treinta años en los varones enfermos. En éstos la enfermedad debuta en la segunda década en forma de miocardiopatía

hipertrofica y arritmias mientras que en mujeres portadoras se manifiesta hacia los cuarenta años con miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca. El trasplante cardíaco es la única opción que puede cambiar el pronóstico de estos pacientes. En pacientes con hipertrofia ventricular izquierda y preexcitación es preciso descartar la presencia de enfermedades de depósito de glucógeno. Una hipertrofia severa, elevación de CK/ALT o retraso mental en un varón joven sugerirá enfermedad de Danon (17). El cribado deberá incluir también a las familiares mujeres asintomáticas.

Glucogenosis tipo III

Se debe a la deficiencia de la enzima desramificante, amilo- α -1,6-glucosidasa. Clínicamente estos pacientes pueden presentar hipoglucemias a partir del primer año de vida, junto con una clínica muy similar a la del tipo I pero más leve (18). Sin embargo, se diferencia de esta última por la presencia de esplenomegalia y porque ésta disminuye, al igual que la hepatomegalia, con la edad. Hay diferentes formas fenotípicas. En general evolucionan con la edad a miopatía muscular, que puede causar incapacidad en los adultos. Alrededor del 80% de los pacientes presentan hipoglucemia en ayunas, con elevación de colesterol y triglicéridos mucho más atenuada que en el tipo I; nunca se detecta hiperuricemia. Después de la administración de adrenalina o glucagón en ayunas, la respuesta de la glucosa es anormal, aunque puede ser normal si se realiza la prueba postprandial. No hay aumento de ácido láctico, pero la cetosis es manifiesta.

La glucogenosis tipo III es una enfermedad genética localizada en el cromosoma 1p21, heredada con carácter autosómico recesivo. Actualmente, se han identificado más de 24 mutaciones en pacientes con glucogenosis tipo III, destacando el hecho de que no hay ninguna predominante como ocurre en otras enfermedades metabólicas hereditarias (19). El diagnóstico se basa en la demostración de la acumulación de glucógeno, de la deficiencia de amilo α -1,6-glucosidasa en hematíes y de la presencia de oligosacáridos ricos en glucosa en la orina. Sin embargo, dada la gran variabilidad fenotípica, en los pacientes que presentan manifestaciones clínicas muy sugerentes y normalidad enzimática en los hematíes se recomienda la investigación de la actividad enzimática en otros tejidos (fibroblastos, hígado y músculo). El tratamiento es el mismo que para la glucogenosis tipo I, pero dado que las hipoglucemias no son tan intensas, sólo en los casos más graves se requiere la alimentación nocturnas nasogástrica.

Glucogenosis tipo IV

Es una enfermedad de transmisión autosómica recesiva causada por un déficit de la amilo-1,4-1,6-transglucosidasa. El gen que codifica para la enzima ramificante está localizado en el cromosoma 3. El defecto enzimático conduce a una ramificación insuficiente del glucógeno, produciendo un polisacárido anormal, semejante a la

amilopectina: cadenas periféricas más largas, escasos puntos de ramificación. Es una enfermedad multisistémica, el glucógeno anormal se acumula en todos los tejidos, especialmente en el hígado, músculo, corazón, piel, intestino, cerebro, espina medular y nervios periféricos. El glucógeno anormal y su insolubilidad originan agresión hepática (20).

También es conocida por la enfermedad de Anderson o amilopectinosis. Se presenta frecuentemente en los primeros meses de vida, con fallo en el crecimiento, retraso motor, seguido de cirrosis progresiva, hipertensión portal, esplenomegalia, ascitis, varices esofágicas, pero también con hipotonía, debilidad y atrofia muscular, contracturas, hipo o arreflexia, y muerte a los 4-5 años por fallo hepático o hemorragia gastrointestinales (21).

La hipoglucemia es poco frecuente pero ocurre en la evolución de la cirrosis. Una cardiomiopatía severa puede ser predominante, a veces fatal (22). Alguno de estos enfermos sobreviven sin enfermedad hepática progresiva. Otros, en la edad adulta, presentan disfunción del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). También puede ser diagnosticada excepcionalmente al nacer. De este modo, existe una gran variabilidad clínica: 1) muerte precoz en el período neonatal, con hipotonía severa y atrofia muscular; 2) miopatía o cardiomiopatía en la infancia; 3) forma adulta con disfunción neurológica y miopatía y 4) forma hepática no progresiva que no necesita de trasplante.

El diagnóstico se lleva a cabo en biopsia hepática demostrándose la acumulación del glucógeno anormal. En la histología aparecerá una arquitectura distorsionada, además de fibrosis intersticial difusa, septos fibrosos alrededor de áreas micronodulares, hepatocitos distendidos con inclusiones basófilas PAS + parcialmente resistentes a la digestión de la diastasa. Se pueden demostrar inclusiones en el músculo, miocardio, SNC e hígado. El diagnóstico definitivo viene confirmado por la actividad enzimática en el hígado, músculo, fibroblastos de la piel; también. Leucocitos y eritrocitos, detección de heterocigotos: actividad enzimática en los leucocitos y fibroblastos. El diagnóstico prenatal es posible midiendo la actividad enzimática en cultivo de amniocitos (23).

1.5.2.2. *Glucogenosis que cursan con intolerancia al ejercicio y mioglobinuria*

Se incluyen aquí las glucogenosis con afectación puramente muscular. Son la glucogenosis tipo VII, déficit de fosfofructoquinasa o Enfermedad de Tarui, la glucogenosis tipo V o Enfermedad de McArdle y las glucogenosis distales.

Glucogenosis tipo VII o enfermedad de Tauri

Se debe a la deficiencia de la enzima fosfofructoquinasa (PFK), cuya función es fosforilar la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato (24). Por lo tanto, un bloqueo de este paso determina la incapacidad para la obtención de energía a partir de la glucosa libre o del glucógeno. La enzima es un tetrámero con tres subunidades: M (músculo), L (hígado) y P (plaquetas) codificadas por genes distintos localizados en los cromosomas 12, 21 y 10, respectivamente. La isoenzima muscular está formada por un único tipo de subunidades (M4). En los hematíes se expresan dos subunidades diferentes, la del músculo (M) y la hepática (L). Los pacientes presentan una miopatía muscular con intolerancia al ejercicio acompañada de calambres, mioglobinuria e hiperuricemia (25). Estos dos últimos síntomas son menos acusados que en la glucogenosis tipo V, entidad clínicamente muy similar. Se diferencia, además, de esta última porque los pacientes presentan anemia hemolítica (como consecuencia del déficit parcial de la fosfofructoquinasa eritrocitaria).

Aunque la acumulación de glucógeno es moderada, éste presenta una estructura lineal parecida a la que se detecta en la glucogenosis tipo IV. Esto se debe al incremento de la G-6-P que se produce como consecuencia del bloqueo. Este incremento activa la glucógeno sintasa, lo que ocasiona un desequilibrio de la relación entre la actividad de esta última enzima y la ramificante. Estos pacientes no requieren una terapia específica, pero es recomendable, a diferencia de la glucogenosis V, no tomar hidratos de carbono antes del ejercicio, dado que provocan una disminución de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos, única fuente alternativa del músculo en estos pacientes.

El diagnóstico se basa en la demostración del déficit enzimático en el músculo o el déficit parcial en los hematíes (26).

Glucogenosis tipo V o enfermedad de McArdle

La sintomatología habitual de los pacientes con esta alteración es intolerancia al ejercicio con fatiga prematura, mialgias, rigidez, debilidad y contracturas musculares (27).

El inicio de los síntomas se suele producir en la infancia, aunque el diagnóstico se suele establecer en la segunda o tercera década de vida ya que los calambres y la mioglobinuria raramente se producen antes de los 10 años de edad. Aunque se han descrito algunos casos inicio tardío de la enfermedad (28-31).

La enfermedad de McArdle (Glucogenosis tipo V, GSDV) está causada por mutaciones en el gen *PYGM* que codifica la isoforma muscular del enzima glucógeno

fosforilasa. Es una de las miopatías metabólicas más frecuentes, con una prevalencia estimada de 1/100000 habitantes (32), siendo la herencia autosómica recesiva.

Tradicionalmente el diagnóstico de la enfermedad de McArdle se basa en los síntomas clínicos junto con estudios bioquímicos e histológicos aunque el diagnóstico definitivo se establece mediante la determinación de la actividad enzimática de fosforilasa en músculo obtenido por biopsia. Estudios moleculares de la última década permiten realizar el diagnóstico genético-molecular en sangre y evitar la biopsia muscular (33).

Glucogenosis distales

El falla enzimático ocurre en la parte final de la vía glucolítica. Son bastante infrecuentes y producen debilidad fija, calambres musculares, intolerancia al ejercicio y, en algunos casos mioglobulinuria.

a) Déficit de fosfogliceratoquinasa (PGK)

La presentación muscular es similar a la enfermedad de McArdle (34). Es infrecuente que se presenten todos los síntomas en el mismo enfermo, aunque se caracteriza clínicamente con anemia hemolítica no esferocítica (también en algunas heterocigotas), disfunción del SNC, los pacientes sufren retraso y, en ocasiones, crisis. Es una miopatía lentamente progresiva que ocasionalmente produce mioglobulinuria. Rosa y colaboradores (1982) (35) y DiMauro y colaboradores (1983) (36) describieron el déficit de PGK asociado a mioglobulinuria recurrente sin anemia hemolítica.

Sugie y colaboradores (1998) (37) describieron la mutación p.T837C en un paciente con la forma miopática más retraso mental y convulsiones, CPK alta o normal, y prueba de ejercicio con curva del ácido láctico anormal. El estudio de la biopsia muscular suele dar normal por lo que el diagnóstico se suele basar en la caracterización molecular del gen *PGKA* localizado en el cromosoma Xq13.

b) Déficit de fosfogliceratomutasa (PGAM)

También conocida como glucogenosis tipo X se caracteriza clínicamente por intolerancia al ejercicio, calambres y ocasionalmente mioglobulinuria. Los pacientes presentan CPK alta en sangre y el test del ejercicio produce una curva ligeramente aumentada para el ácido láctico aunque de modo reducido. La biopsia muscular muestra acúmulos de glucógeno subsarcolemal y agregados tubulares (38).

El diagnóstico se realiza midiendo la actividad la enzima en el músculo, la cual suele ser muy reducida (5-7%) en los pacientes. El gen que codifica para la fosfogliceratomutasa se encuentra en el cromosoma 7p12-p13, las primeras 3

mutaciones puntuales identificadas se encontraron en el exón 1 en 5 pacientes diferentes, todos afroamericanos (39).

c) Déficit de β -enolasa

Esta glucogenosis tipo XIII se hereda de forma autosómica recesiva. El comienzo de los síntomas suele darse en la 3ª década de la vida y cursa con fatiga y mialgias tras el ejercicio intenso aunque no hay calambres, la fuerza es normal. Es una enfermedad progresiva (40). La CPK aumenta en los periodos de crisis y el test del ácido láctico muestra un patrón anormal. El estudio de la biopsia muestra un patrón con fibras de gran variabilidad en sus tamaños, sin acúmulos de glucógeno y una tinción inmunohistoquímica muy reducida o ausente para la β -enolasa, ya que la actividad enzimática suele estar en torno al 5% en los pacientes.

d) Déficit de lactato deshidrogenasa (LDH)

También es autosómica recesiva. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima tetramérica compuesta de dos subunidades: M y H resultando en cinco isoenzimas. El gen se encuentra en el cromosoma 11 (41).

La clínica consiste en intolerancia al ejercicio, calambres y, en ocasiones, mioglobulinuria. En algunos pacientes japoneses se han descrito lesiones cutáneas. Analíticamente destaca la presencia de un aumento de la CPK con niveles de LDH séricos muy disminuidos. El test de ejercicio resulta en un aumento del ácido pirúvico pero no del láctico (42).

e) Déficit de aldolasa A

Esta glucogenosis tipo XII se hereda de manera autosómica recesiva. Existen tres isoformas de la aldolasa (A, B, C). En el músculo y en glóbulos rojos predomina la isoforma A, codificada por el gen ALDOA presente en el cromosoma 16. El único caso descrito presentaba intolerancia al ejercicio y debilidad tras cuadros febriles (43).

2. CATABOLISMO DEL GLUCÓGENO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

2.1. Estructura tisular, celular y molecular del músculo esquelético.

El tejido muscular es un tejido que tiene la propiedad de contraerse, es decir, disminuir su longitud en respuesta a un estímulo. El mecanismo de contracción está basado en la disposición de forma organizada de proteínas fibrilares en el citoplasma y enlazadas por puentes intermoleculares. La contracción se produce por la

reorganización de los puentes intermoleculares con la utilización de energía química. Existen tres tipos de tejido muscular:

- **Músculo esquelético:** es el responsable del movimiento voluntario o consciente. La disposición de las proteínas estructurales determina la aparición de estriaciones transversales de ahí el nombre de *músculo estriado*.
- **Músculo liso:** constituye el componente contráctil de estructuras como los vasos sanguíneos, tubo digestivo, útero y vejiga urinaria. Está sometido a control autónomo y hormonal, por lo que se considera como músculo involuntario. La disposición de las proteínas no da lugar en este caso a la presencia de estriaciones, por lo que se da el nombre de *liso*.
- **Músculo cardíaco:** tiene características intermedias entre los dos anteriores y es el responsable de la contracción rítmica del corazón. Su aspecto también es estriado, aunque se distingue fácilmente del músculo esquelético.

El músculo esquelético está compuesto por unidades contráctiles denominadas fibras musculares, unidas unas a otras por tejido colágeno. Su tamaño es variable, con un diámetro que puede oscilar entre 10 y 100 μm y una extensión de hasta 35 cm. Su membrana plasmática o sarcolema está constituida por una estructura interna denominada sarcoplasma y una membrana externa o basal, ambos íntimamente unidos. Cada fibra muscular está constituida por miofibrillas, estructuras alargadas y cilíndricas que se disponen de forma paralela unas a otras en el sarcoplasma.

La contracción está controlada por fibras nerviosas, que se ramifican en el interior del músculo para inervar a un grupo de fibras musculares, descritas como unidad motora. La excitación de un nervio motor origina una contracción simultánea de todas las fibras musculares correspondientes a la unidad motora.

Las células musculares individuales (fibras musculares) se agrupan en haces alargados llamados fascículos, con un tejido de soporte denominado endomisio que se sitúa en los espacios entre las fibras musculares. Cada fascículo está rodeado a su vez por tejido conectivo laxo denominado perimisio. Toda la masa muscular está incluida en una densa vaina de colágeno denominada epimisio, atravesado por grandes vasos y nervios que se van ramificando en el perimisio y endomisio por todo el músculo (figura 9).

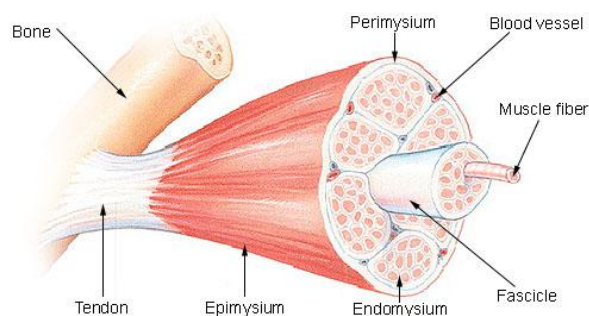


FIGURA 9. Estructura de la fibra muscular.

http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Physiology/Muscular/muscle_structure.jpg

2.2. TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

Clásicamente, a través de la simple observación macroscópica, se va a establecer la existencia de dos tipos de fibras: rojas y blancas.

Las primeras son de menor tamaño y contienen abundantes mitocondrias, así como una gran cantidad de mioglobina, una molécula de almacenamiento de oxígeno análoga a la hemoglobina, lo que justifica el color rojo de estas fibras.

Las segundas son de mayor tamaño en la sección transversal, contienen pocas mitocondrias y relativamente poca mioglobina; también tienen una vascularización relativamente pobre. Sin embargo, son ricas en glucógeno y enzimas glucolíticas. Son de color blanco (44).

Posteriormente con la introducción de las técnicas histoquímicas se pudo identificar los grados de actividad enzimática que existen en los diferentes tipos de fibras, estableciendo una primera distinción entre las fibras tipo I, de metabolismo predominantemente oxidativo, y las de tipo II o fundamentalmente glucolíticas (45). Técnicas histoquímicas más complejas, como la detección de la actividad ATPasa han permitido confirmar esta clasificación. Se han diferenciado las fibras en dos tipos básicos, I y II, en función de la actividad, siendo las de tipo II las que presentan mayor actividad (46). Al modificar la alcalinidad del medio de incubación, se pudo establecer una subdivisión en las fibras de tipo II: las denominadas fibras tipo IIa experimentan una reacción débil frente a la ATPasa en cualquier medio ácido (pH 4.2, pH 4.6). Por el contrario, las de tipo IIb presentan una reacción fuerte en medio moderadamente ácido (pH 4.6), que se debilita al aumentar la acidez (pH 4.3). A partir de los estudios realizados en un modelo animal (músculo de rata), actualmente se conoce un tercer tipo de fibras tipo II, el tipo IIc, que mantiene una reacción fuerte incluso en medios muy ácidos.

En base a los estudios de función contráctil también se han podido clasificar las fibras musculares en dos grandes grupos: fibras de contracción rápida (*fast-twitch* o FT) y fibras de contracción lenta (*slow-twitch* o ST).

Las fibras de contracción lenta poseen una velocidad de contracción entre 50-80 m/s y son fácilmente estimulables; mientras que las rápidas se estimulan con mayor dificultad, pero poseen velocidades de conducción superiores, entre 70-110 m/s.

Cuando se aplica un estímulo a una fibra de contracción rápida se observan dos tipos de respuesta: unas son relativamente resistentes a la fatiga mientras que otras la desarrollan fácilmente. En las fibras lentas, sin embargo, el estímulo repetido de baja frecuencia no provoca la aparición de fatiga.

Actualmente y combinando los diferentes conocimientos estructurales, metabólicos y funcionales, se considera que existen tres tipos de fibras:

- Fibras tipo I: de metabolismo predominantemente oxidativo o aeróbico. Se caracterizan por una oxidación lenta de la glucosa y una mayor resistencia a la fatiga. Son fibras de contracción lenta y se corresponden con las fibras rojas. Su actividad ATPasa es baja (figura 10).
- Fibras tipo IIa: tienen un metabolismo intermedio entre las oxidativas y las glucolíticas; presentan una glucólisis oxidativa rápida y su fatigabilidad es intermedia. Son fibras de contracción rápida y pertenecen al grupo de fibras rojas. Poseen actividad ATPasa a pH alcalino y en menor grado actividades NADH-TR (nicotinamida adenosina dinucleótido tetrazolio-reductasa) y SDH (succinato deshidrogenasa) (figura 11B).

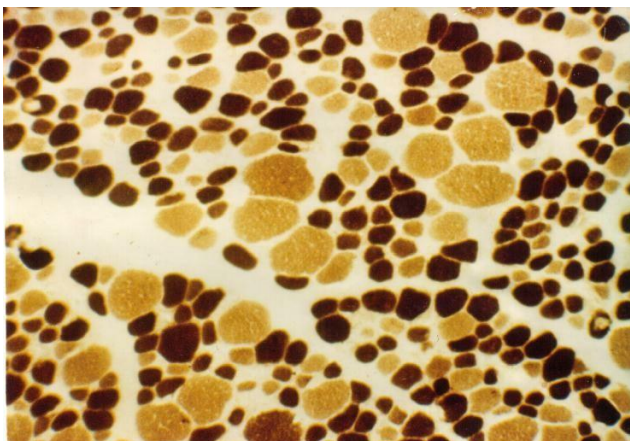


FIGURA 10. Inmunohistoquímica de un corte muscular; con la técnica ATPasa a pH 9.4 las fibras tipo I son claras, mientras que las tipo IIa y IIb son oscuras. <http://conganat.uninet.edu/6CVHAP/autor es/trabajos/T236/I006.JPG>

- Fibras tipo IIb: glucolíticas o anaeróbicas. Tienen una glucólisis rápida y son sensibles a la fatiga. Son fibras de contracción rápida y potente. Anatómicamente se corresponden con las fibras blancas. Poseen actividad ATPasa a pH alcalino y moderadamente ácido, y en menor, grado, actividades NADH-TR y SDH (figura 11B).

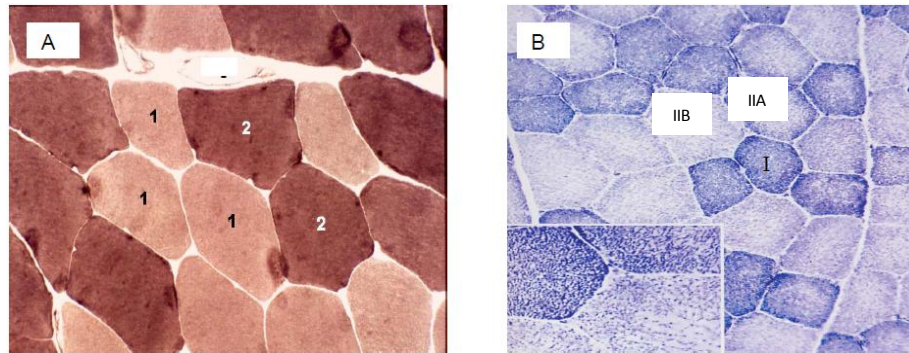


FIGURA 11. Cortes histológicos de una biopsia muscular. En A se muestra técnica histoquímica para miosina ATPasa menos abundante en fibras tipo I (1) y más en fibras tipo II (2). En B se muestra técnica histoquímica para SDH más abundante en fibras tipo I, menos en IIA y mucho menos en IIb. <http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/autor2006/Obesidad/2/2370>

2.3. ULTRAESTRUCTURA DE LA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA

El músculo esquelético, junto al cardíaco, forma parte del músculo estriado. Se denomina así, por el aspecto que presentan los cortes de tejido al microscopio óptico. Esto se debe a la organización sarcomérica que presenta, con las características bandas Z, I, A, H y la línea M (figura 12). A diferencia del músculo liso, que carece de esta disposición ordenada de las fibras, además de poseer otras características metabólicas y de innervación diferentes.

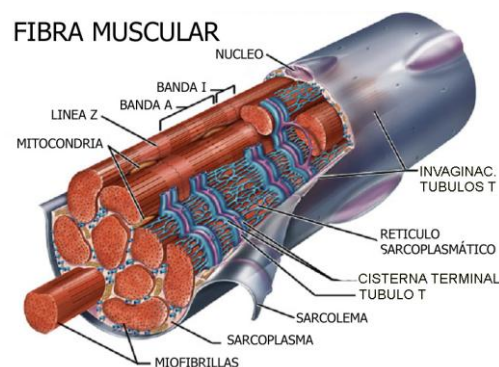


FIGURA 12. Organización sarcomérica de la fibra muscular. <http://magisnef.files.wordpress.com/2007/04/untitled-1-copy.jpg>

Esta alta organización del músculo esquelético hace pensar que todo es homogéneo, y nada más lejos de la realidad. Como ya hemos visto, aún en un mismo músculo puede haber fibras con diferentes propiedades metabólicas y diferente capacidad contráctil, lo que las hará responder ante un mismo estímulo de diferente manera.

Las fibras que componen cada unidad motora son el resultado de la fusión de células diferenciadas, llamadas miocitos, durante el desarrollo. En su interior las miofibrillas constan de sucesiones de sarcómeros unidos, formando la banda Z, que se ve rodeado por el túbulo T. Este túbulo es una invaginación de la membrana que permite poner en contacto la membrana plasmática con el retículo sarcoplásmico (figura 12). El túbulo T está en contacto, a todo lo largo de la circunferencia del sarcómero, con las cisternas terminales. Éstas son el resultado de un ensanchamiento del retículo sarcoplásmico. Esta relación entre membranas (plasmática, túbulo T y cisternas terminales) es esencial para la regulación de la contracción muscular.

La organización sarcomérica es tal, que no se aleja mucho de una disposición totalmente cristalina, sobre todo en músculos que requieren una gran potencia. La visión de bandas es el resultado de la colocación de dos tipos de proteínas esenciales:

- Actina, que forma parte esencial de los filamentos delgados.
- Miosina, que forma parte integral de los filamentos gruesos.

En un corte transversal de un sarcómero, se observa que un filamento delgado se rodea de tres gruesos, uno grueso se rodea de seis delgados. La contracción se produce gracias a la conversión que realiza la cabeza globular de la miosina, de la energía de hidrólisis del ATP a energía mecánica. La contracción se debe al acortamiento de las zonas I y H, por el desplazamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos (figura 13). Es importante la polaridad de los filamentos de actina, ya que si no el desplazamiento se realizaría en sentido contrario, desplazándose la estructura sarcomérica en lo que sería elongación, no contracción.

La actividad ATPasa se localiza en la cabeza globular de la miosina, y es el motor molecular más antiguo que se conoce. El estudio de su estructura y su actividad ha permitido caracterizar otro tipo de proteínas que permiten el movimiento, no solo sobre actina, sino sobre microtúbulos, no habiéndose caracterizado ninguna que deslice filamentos intermedios.

ORGANIZACIÓN DE LA FIBRA MUSCULAR

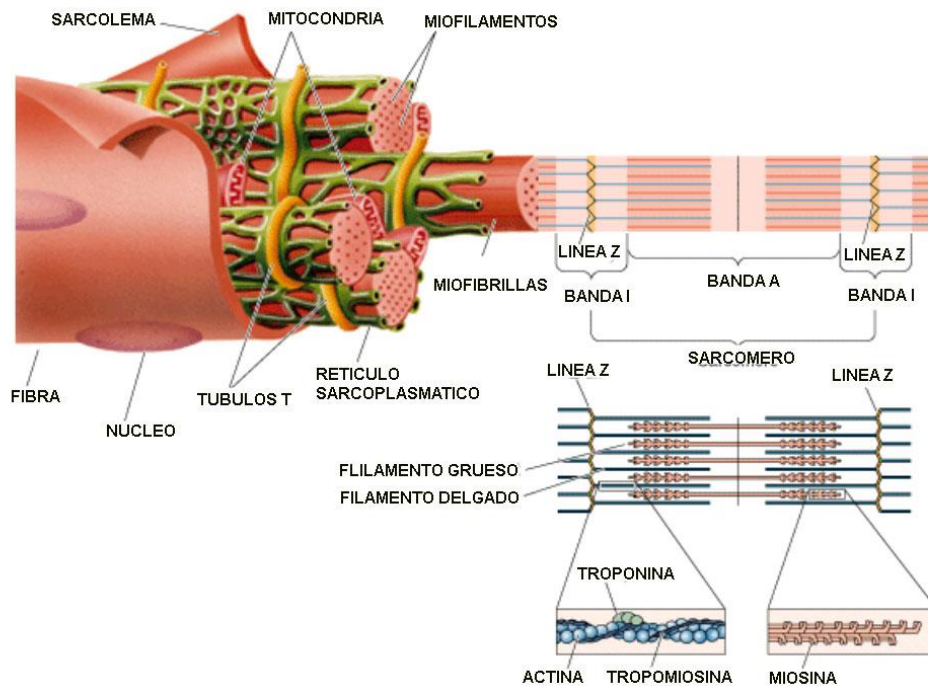


FIGURA 13. Organización de la fibra muscular.

<http://www.google.es/imgres?imgurl=http://magisnef.files.wordpress.com/2007/04/untitled-1-copy.jpg>

En el sarcómero no sólo hay actina y miosina, sino que existen toda una serie de proteínas que hacen posible su funcionamiento, tabla II:

1) Contráctiles: generan la fuerza durante las contracciones. Son la actina y la miosina.

2) Reguladoras: ayudan a activar y desactivar el proceso de la contracción. Son la tropomiosina y la troponina. En el músculo relajado, la miosina no puede unirse a la actina porque la tropomiosina bloquea el sitio de unión. La troponina mantiene en su sitio a la tropomiosina.

3) Estructurales: mantienen a los filamentos gruesos y delgados en su lugar, dan elasticidad y extensibilidad a las miofibrillas, las conectan con el sarcolema y la matriz extracelular. Son la titina, miomesina (que forma la línea M), nebulina y distrofina (figura 14).

PROTEÍNA	ESTRUCTURA	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
Miosina	Estructura superenrollada cada 2 moléculas y posterior asociación con polaridad enfrentada. El eje de simetría, se encuentra en la línea m.	Principalmente en los filamentos gruesos.	Interacción con la actina y función ATPasa para el desarrollo del esfuerzo mecánicos.
Actina	Asociación de monómeros que dan lugar a un filamento con estructura similar a una doble hélice.	Principalmente en los filamentos delgados.	Permite el deslizamiento sobre los filamentos de miosina.
Tropomiosina (TM)	Heterodímero organizado en forma $\alpha\beta$ - helicoidal.	Asociada a los filamentos delgados, a la actina.	Regula la disponibilidad de unión a la miosina de los filamentos delgados, al tapar el sitio de unión a miosina en ausencia de Ca^{2+} .
Troponina (Tn)	Formada por tres subunidades: Tn T, Tn I y Tn C.	En la cabeza-cola de la tropomiosina.	Tn T y Tn I se unen a TM mientras que Tn C es la unidad reguladora con capacidad para 4 iones Ca^{2+} . Las 3 subunidades están implicadas en el cambio de localización de TM cuando se une a calcio, dejando activo el sitio de unión a miosina.
Titina	Proteína de gran tamaño molecular del citoesqueleto muscular.	Entre la línea M y del disco Z.	Permite unir la miosina a los discos Z (a pesar de la contracción, pues es flexible). Además de mantenerla paralela a los filamentos de actina.
Nebulina	Formada por la repetición de un dominio de unión a actina.	En la línea I.	Los filamentos de titina y nebulina organizan el sarcómero. Orienta la polaridad de los filamentos de actina además de unirlos al disco Z y mantenerlos paralelos.
Actinina	Homodímero con subunidades de 95-100 kDa de peso molecular	En los filamentos de actina en la línea Z.	Une los filamentos de actina entre sí y los ancla a la membrana celular.
Miomesina	Proteína del citoesqueleto de gran tamaño molecular.	Línea M.	Mantiene el eje de simetría de la asociación de la miosina en la línea M junto con la proteína C.
Distrofina	Proteína de gran peso molecular perteneciente al cito esqueleto muscular.	Entre los filamentos delgados y el sarcolema.	Proteína estructural que constituye una unión elástica entre las fibras de actina del citoesqueleto y la matriz extracelular que permite disipar la fuerza contráctil.

TABLA II. Proteínas del sarcómero.



Las fibras musculares tipo I y II, son innervadas por las motoneuronas ubicadas en el asta anterior del cordón espinal, las ramificaciones terminales de los axones establecen sinapsis con cada fibra muscular. La membrana postsináptica está plegada lo cual contribuye a aumentar la superficie en la cual puede actuar el neurotransmisor. En los botones sinápticos hay mitocondrias que suministran energía principalmente para la síntesis de acetil-colina, ACh. La ACh es sintetizada y es almacenada en vesículas, unas 300.000 por placa motora. Ligada a la matriz de la lámina basal se encuentra la acetilcolinesterasa, enzima que destruye a la ACh. El potencial de acción de la motoneurona provoca la liberación de aproximadamente 125 vesículas de ACh en un proceso dependiente de Ca^{2+} extracelular. La ACh se une a receptores cerca de la entrada de los pliegues de la membrana postsináptica.

Cada receptor es un complejo proteico de 275 kDa, las subunidades que lo componen atraviesan la membrana y se sitúan formando un conducto tubular. El conducto permanece contraído hasta que se unen moléculas de ACh a las dos subunidades, lo cual provoca un cambio conformacional que abre el canal. Por el canal pueden pasar todos los iones positivos importantes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), pero en la práctica fluyen muchos más iones Na^+ lo cual genera un potencial de placa motora terminal que inicia un potencial de acción el que se conduce por el sarcolema. La ACh liberada continúa activando receptores mientras persista en él, sin embargo, se elimina rápidamente mediante dos mecanismos, la mayor parte es destruida por acetilcolinesterasa y una pequeña parte difunde fuera del espacio sináptico.

En la fibra muscular los potenciales de acción penetran hasta la vecindad de las miofibrillas por los túbulos T. En un proceso en el que intervienen canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (de DHPR) en la membrana del túbulo T y canales de Ca^{2+} no dependientes de voltaje (de RyR) en la membrana de los sacos laterales del retículo sarcoplasmático, RS, el Ca^{2+} almacenado en los sacos laterales sale al sarcoplasma, a favor de gradiente. El aumento de la concentración de Ca^{2+} (desde $\pm 10^{-7}$ molar hasta $\pm 2 \times 10^{-4}$ molar) produce un aumento de la afinidad de la troponina C por el Ca^{2+} , esta unión provoca un cambio conformacional de troponina la que a su vez arrastra a tropomiosina. Los movimientos de troponina y tropomiosina exponen un sitio activo en actina al que se unen las cabezas de miosina. Otro lugar de las cabezas de miosina, una miosina ATPasa, hidroliza ATP, la energía liberada se usa para que las cabezas de miosina den un golpe de potencia, desde los 90° a los 45° , arrastrando a los miofilamentos delgados de actina entre los miofilamentos gruesos de miosina. Las cabezas de miosina se sueltan por efecto de la presencia de ATP, retornan a los 90° y se reinicia el proceso que se repite cíclicamente.

Esto es la contracción muscular según la “teoría de deslizamiento de miofilamentos”. Mientras el Ca^{2+} permanezca elevado en el sarcoplasma, lo cual depende de la llegada de potencial de acción al túbulo T, las cabezas de miosina seguirán dando “golpes de potencia”. Terminada la estimulación una bomba de Ca^{2+} , la Ca^{2+} -ATPasa1 del retículo sarcoplasmático, SERCA1, situada en los túbulos longitudinales del RS bombea Ca^{2+} hacia su interior. Esta bomba puede concentrar unas 10.000 veces el Ca^{2+} . Además, en el RS la calsecuestrina liga 40 veces más Ca^{2+} que el que debería hallarse en el estado iónico. La transferencia de Ca^{2+} al RS disminuye su concentración en el sarcoplasma, perdiéndose la afinidad de troponina C por Ca^{2+} , así esta experimenta un cambio conformacional que produce el arrastre de tropomiosina y su posicionamiento sobre el sitio activo de actina impidiendo la formación del complejo actina-miosina lo que provoca la relajación.

2.4.1. La Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico

La bomba de Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico o SERCA se identificó y purificó por primera vez en retículo sarcoplásmico de músculo esquelético (48). La SERCA es una proteína integrada en las membranas del RS. Transporta 2 iones Ca^{2+} desde el citoplasma al lumen de este compartimento utilizando la energía de hidrólisis del ATP en presencia de Mg^{2+} (49). Además funciona como una bomba electrogénica en relación 1:1 $\text{Ca}^{2+}/1\text{H}^+$.

La SERCA es un producto de una familia multigénica. Se han identificado 3 genes que dan lugar a las isoformas SERCA1, SERCA2 y SERCA3, y a una diversidad adicional de variantes de estas isoformas mediante procesamiento alternativo. El gen *ATP2A1* codifica las proteínas SERCA1a (en adultos) y SERCA1b (neonatal) que difieren en su región C-terminal (50). Ambas son específicas del músculo esquelético, contribuyendo al flujo de Ca^{2+} implicado en contracción/relajación muscular.

Los estudios más exhaustivos sobre la estructura y función de la SERCA se han realizado en RS de músculo esquelético, que contiene concretamente la isoforma SERCA1. Estudios con proteasas, con anticuerpos monoclonales y antipéptidos producidos frente a determinados segmentos, y transferencia de energía de fluorescencia (51-54), entre otros, han contribuido a la elaboración de un modelo estructural. Además, la microscopía crioelectrónica ha permitido obtener una información más amplia sobre la estructura de la SERCA, así como de los mecanismos cinéticos de la proteína y de los cambios conformacionales asociados con la unión de Ca^{2+} (55, 56).

La proteína SERCA está constituida por unos 1.000 aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 110 KDa. Presenta los extremos N-terminal y C-terminal hacia el citoplasma y 10 dominios transmembrana. Tiene una cabeza globular constituida por 2 dominios citoplasmáticos, uno de los cuales es el dominio catalítico, que es donde se encuentra el ácido aspártico que se fosforila y el sitio de unión de ATP (figura 15).

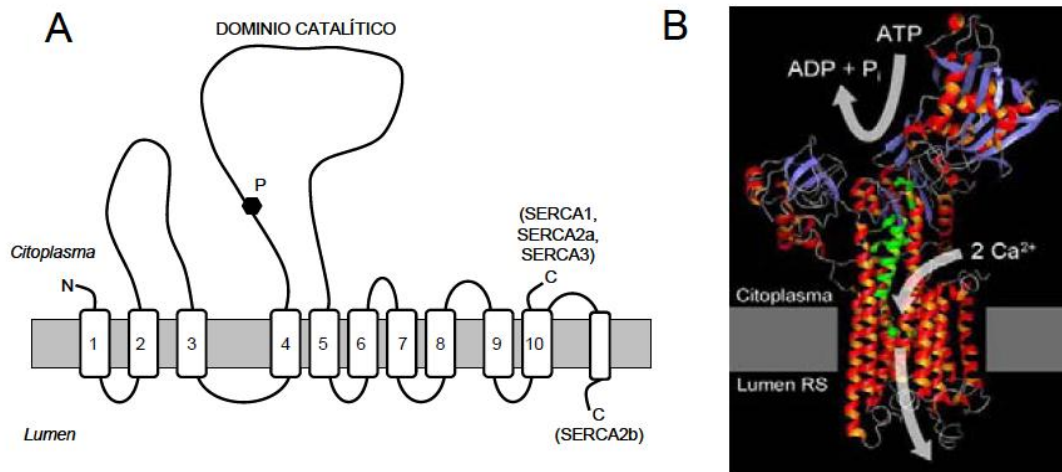


FIGURA 15: La Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico (57). A, representación esquemática de la estructura de la SERCA, mostrando los segmentos transmembranales numerados, el dominio catalítico, el sitio de fosforilación (P) y el extremo C-terminal para las distintas isoformas. B, modelo tridimensional de la SERCA1.

La SERCA1 pertenece a la familia de las ATPasas tipo-P. Se denominan así porque fosforilan un resto aspártico durante su ciclo catalítico. En este ciclo pasan por dos estados: E1, abierto hacia el citosol y más estable en la forma no fosforilada, y E2, más estable en la forma fosforilada y abierto hacia el compartimento de salida. De este modo, cuando la SERCA se encuentra en su conformación desfosforilada presenta una alta afinidad por el Ca^{2+} , y los puntos de unión de este ion se encuentran expuestos hacia el citosol; en cambio, cuando se produce la fosforilación se induce un cambio conformacional que dirige el lugar de reconocimiento de Ca^{2+} hacia el lumen del retículo sarco(endo)plásmico, mostrando una baja afinidad de la proteína por este ion. Siguiendo este mecanismo, la energía liberada por la hidrólisis de ATP durante un ciclo de fosforilación/desfosforilación permite a la SERCA transportar dos iones Ca^{2+} a través de la membrana y en contra de gradiente electroquímico (figura 16).

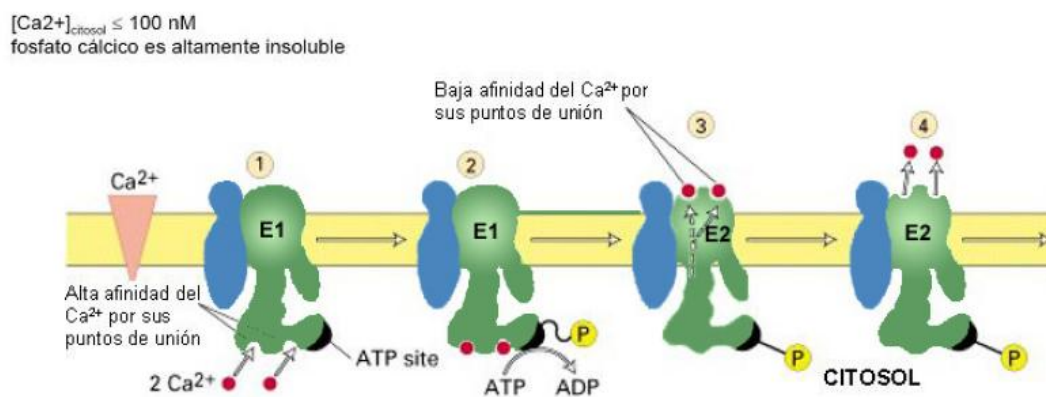


FIGURA 16: Cambios conformacionales de la SERCA en el transporte de Ca^{2+} a través de las membrana (58).

2.4.2. TIPOS DE CONTRACCIÓN MUSCULAR

ISOTÓNICA O DINÁMICA:

Es el tipo de contracción muscular más común, y el término significa la misma tensión (del griego "isos" = igual; y "tonikos" = tensión o tono). Como el término expresa, significa que durante una contracción isotónica la tensión debería ser la misma a lo largo del total de la extensión del movimiento. Sin embargo, la tensión de la contracción muscular está relacionada con el ángulo, siendo la máxima contracción alrededor de los 120 grados, y la menor alrededor de los 30 grados.

ISOMÉTRICA O ESTÁTICA:

Se refiere al tipo de contracción en la cual el músculo desarrolla una tensión sin cambiar su longitud ("iso" igual; y "metro" = unidad de medición). Un músculo puede desarrollar tensión a menudo más alta que aquellas desarrolladas durante una contracción dinámica, vía una contracción estática o isométrica. La aplicación de la fuerza de un atleta en contra de una estructura inmóvil especialmente construido, u objetos que no podrán ceder a la fuerza generada por el deportista, hace acortamiento visible del músculo y los filamentos de actina permanecen en la misma posición.

2.5. ENERGÉTICA DE LA CONTRACCIÓN MUSCULAR

La concentración de ATP presente en la fibra muscular, 7-8 mM aproximadamente, permite mantener la contracción durante 1 a 2 segundos como máximo. Una vez que el ATP ha sido hidrolizado a ADP, este es refosforilado para formar ATP en una fracción de segundo. Para esta refosforilación existen varias fuentes de energía.

La primera fuente es la fosfocreatina, FC, cuya cantidad es también muy pequeña, unas 5 veces mayor que la del ATP. La energía combinada del ATP y de la FC es capaz de producir una contracción máxima durante 5 a 8 segundos.

La siguiente fuente de energía es el glucógeno muscular. La rápida degradación enzimática del glucógeno para liberar glucosa y llevarla hasta ácido pirúvico libera energía para convertir ADP en ATP, el cual puede ser utilizado directamente para proporcionar energía a la contracción muscular o para volver a llenar los depósitos de FC. La importancia de este mecanismo es doble; en primer lugar, las reacciones tienen lugar en ausencia de oxígeno, en segundo lugar, la velocidad de formación de ATP es unas dos veces y media más rápida que cuando los nutrientes reaccionan con el oxígeno. La acumulación de productos finales de la glucólisis es tan elevada que la glucólisis por sí sola no puede mantener una contracción muscular sostenida durante más de 1 minuto aproximadamente.

La fuente final de energía es el metabolismo oxidativo; más del 95 % de la energía procede de éste. Los principales nutrientes consumidos son hidratos de carbono y grasas y, en casos excepcionales proteínas. En caso de actividad muscular máxima, durante muchas horas, la mayor proporción de energía procede de las grasas pero, para períodos de 2 a 4 horas, hasta la mitad de la energía puede proceder del glucógeno almacenado antes de que se agoten las reservas.

3. ENFERMEDAD DE McARDLE

La glucogenosis Tipo V o enfermedad de McArdle (OMIM: 232600) es una de las miopatías metabólicas más frecuentes. Fue descrita en 1951 por Brian McArdle (59), identificándose la alteración enzimática que causaba la enfermedad en 1959 (60, 61). La enzima responsable es la glucógeno fosforilasa muscular o miofosforilasa (α -1,4-glucan ortofosfato glucosiltransferasa, EC 2.4.1.1) que inicia la ruptura del glucógeno mediante la fosforilación de los residuos α -1,4-glucosil con liberación de glucosa-1-fosfato (62) (figura 17).

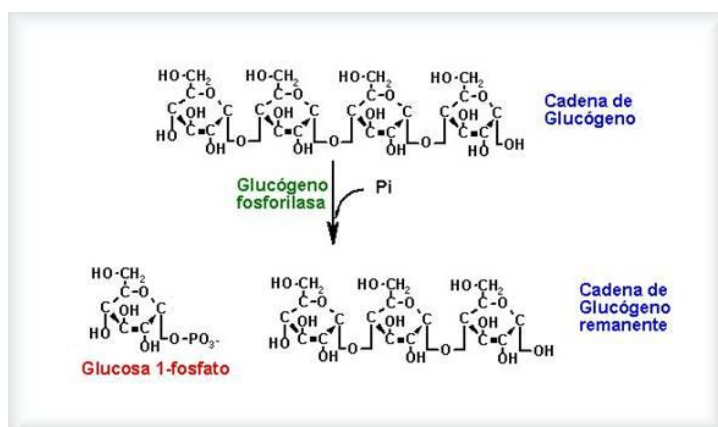


FIGURA 17. Representación de la degradación del glucógeno.

<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/degradacion%20glucogeno1.html>

3.1. GLUCÓGENO FOSFORILASA MUSCULAR O MIOFOSFORILASA

3.1.1. Regulación de GP

Existen tres isoformas de GP codificadas por tres genes diferentes: *PYGB* (cerebral), *PYGL* (hepática) y *PYGM* (muscular). La miofosforilasa, GPM, es un homodímero de 2 subunidades de la isoenzima muscular M (MM), cada una de aproximadamente unos 97.000 Da (63), que cataliza la primera reacción en la degradación del glucógeno (figura 17).

Esta enzima está regulada por interacciones alostéricas y por modificación covalente, como ya hemos señalado en el apartado 1.4. El proceso de fosforilación/desfosforilación produce dos formas de GP: fosforilasa a, que posee un grupo fosforilo esterificado en la serina-14 (64) de cada una de sus subunidades, y la fosforilasa b, que carece de los grupos fosforilos. Los inhibidores alostéricos de la fosforilasa ATP, G-6-P y glucosa, y su activador alostérico, AMP, interaccionan de manera diferente con la forma fosforilada y desfosforilada del enzima, resultando así un proceso regulador extremadamente sensible. De esta manera, los niveles elevados de AMP activan la forma b de la enzima y el ATP y la G-6-P la inhiben.

Superpuesto a este control alostérico, existe el control por interconversión enzimática mediante la acción de tres enzimas (figura 18):

1. Fosforilasa quinasa, que fosforila específicamente la serina-14 de la glucógeno fosforilasa b.
2. Proteína quinasa dependiente de AMPc, que fosforila y, de este modo, activa la fosforilasa quinasa.
3. Fosfoproteína fosfatasa-1, que desfosforila y, por tanto, inactiva la glucógeno fosforilasa a y la fosforilasa quinasa.

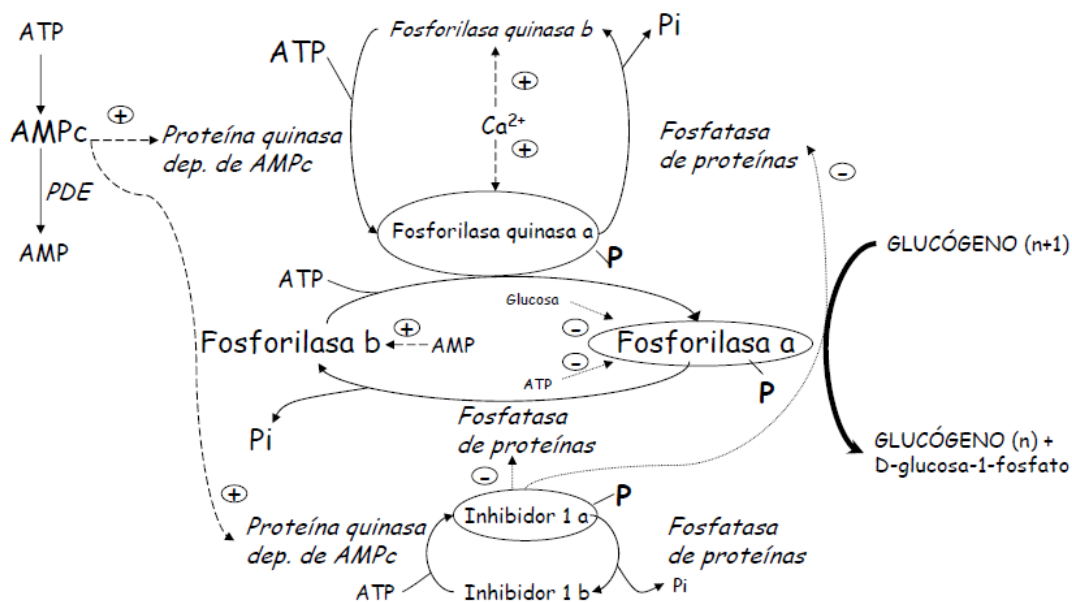


FIGURA 18. Regulación de la glucógeno fosforilasa.

http://www.fmv-uba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomedico/segundo_a%C3%B1o/bioquímica.pdf

Por otro lado, el control neural está mediado por la concentración de iones calcio vía calmodulina. Los iones calcio liberados por el retículo sarcoplasmático, inician la contracción muscular uniéndose a la subunidad-γ de la calmodulina de la

fosforilasa quinasa, quedándose así activada. Esta enzima fosforila la glucógeno-fosforilasa, en su forma de más alta actividad (fosforilasa a), induciendo la ruptura del glucógeno. El control hormonal de la actividad enzimática está mediado por la cascada glucogenolítica, en respuesta a la adrenalina que activa la proteína quinasa dependiente de AMPc. Esta enzima activa la fosforilasa quinasa mediante fosforilación, lo que provoca un aumento en la fosforilasa a (figura 19).

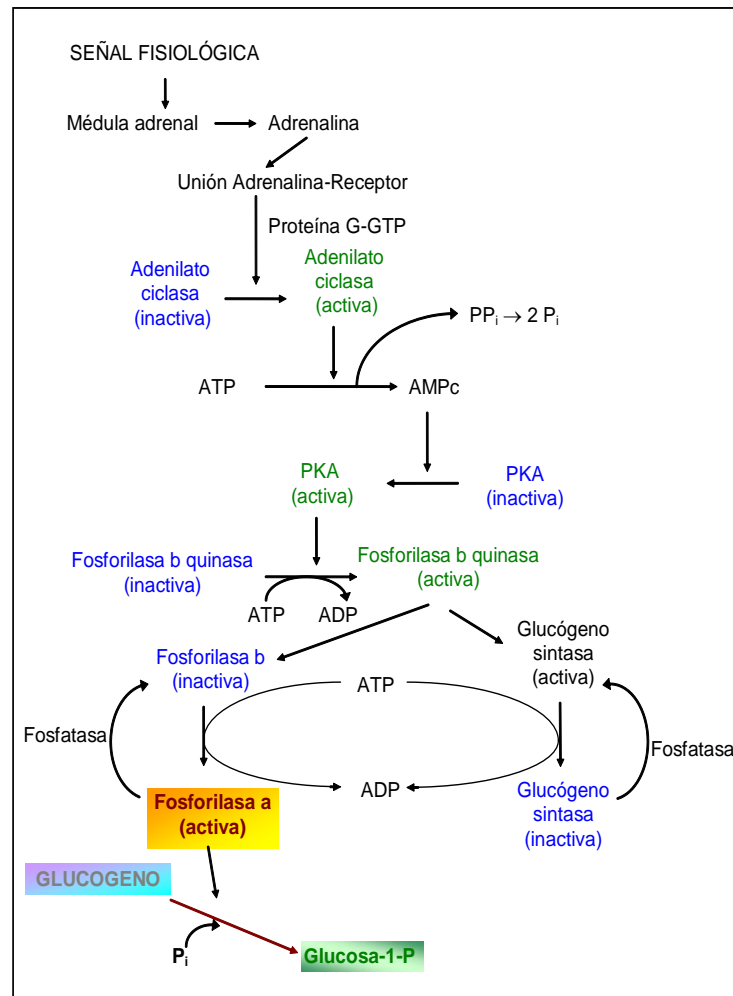


FIGURA 19. Mecanismo celular de activación de la degradación del glucógeno. GTP: guanosín trifosfato, ATP y ADP: adenosín tri y difosfato, respectivamente, AMPc: adenosín monofosfato cíclico, Ppi: pirofosfato, Pi: fosfato inorgánico, PKA: proteínaquinasa dependiente de AMPc

La glucógeno fosforilasa es también una enzima alostérica compleja con dos conformaciones, una en estado activo o “R” y otra inactiva o “T” (figura 20). La interconversión entre los dos estados de la enzima es posible gracias a la fosforilación o mediante la unión de sus ligandos alostéricos en distintas zonas de la enzima (65).

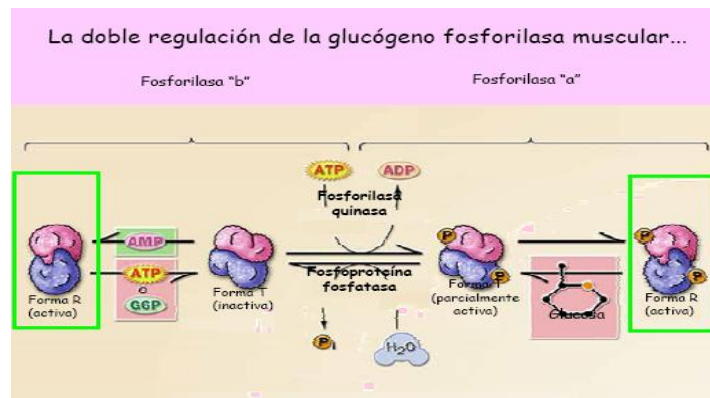


FIGURA 20. Esquema de la doble regulación de la glucógeno fosforilasa muscular.
http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_Farmacia/tema23.htm

La isoenzima muscular puede ser activada hasta el 80%, de su capacidad total, por el AMP. En la estructura tridimensional de la enzima, estas zonas de fosforilación y de unión a AMP están en estrecha proximidad (figura 21). Así, la isoenzima muscular es sensible tanto a señales externas como a cambios en la concentración de diversos metabolitos intracelulares, los cuales indican el balance energético en el interior celular.

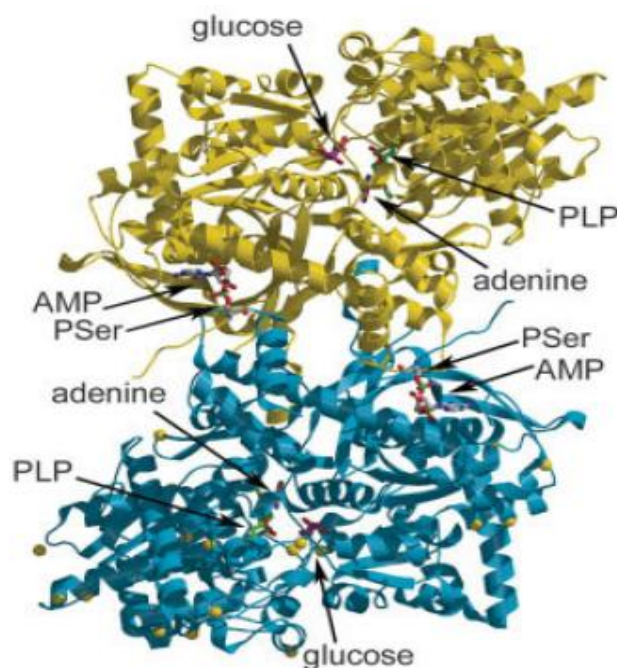


FIGURA 21. Estructura cristalina de la glucógeno fosforilasa a (66).

3.1.2. Dominios estructurales y centros de unión

Las estructuras de rayos X de elevada resolución de la fosforilasa a y de la fosforilasa b fueron determinadas por Robert Fletterick (67) y Louise Johnson (68), respectivamente. A pesar de la ausencia del fosfato unido a serina, la estructura de la fosforilasa b es muy similar a la de la fosforilasa a. Ambas estructuras poseen dos dominios, un dominio N-terminal (restos aminoacídicos del 1-484) y un dominio C-terminal (484-842). El dominio N-terminal está a su vez dividido en un subdominio interfacial (aminoácidos 1-315), que incluye el centro de modificación covalente (serina-14), el centro de unión del efector alostérico y el lugar de dimerización; Y un subdominio de unión del glucógeno (316-484), que contiene el “centro de almacenamiento del glucógeno”. El centro catalítico se localiza en el centro de la subunidad, donde los dos subdominios coinciden con el dominio C-terminal (figura 22).

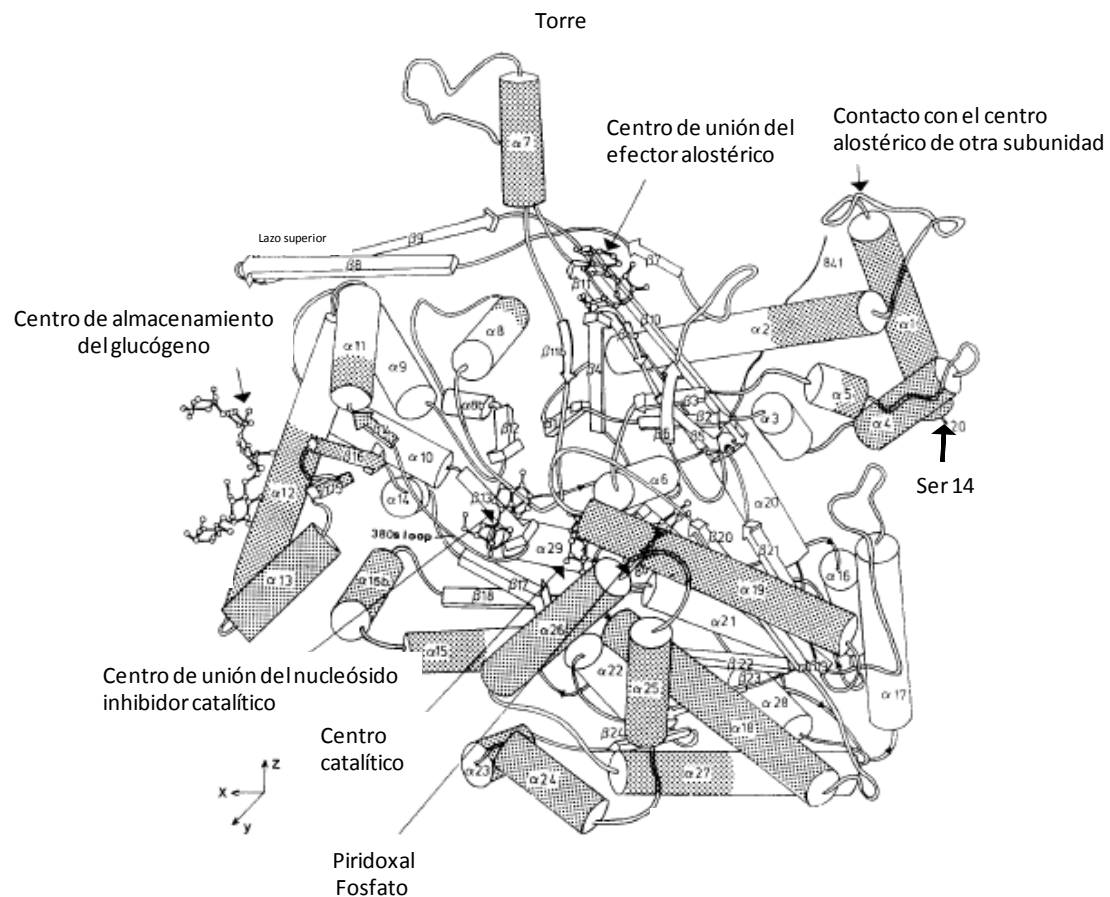


FIGURA 22. Diagrama de cintas de una subunidad de la fosforilasa b. El AMP se muestra unido al mismo tiempo al centro de unión del efector alostérico y al centro de unión del nucleósido inhibidor. La G-1-P se encuentra unida al centro catalítico. El piridoxal fosfato, el cual se muestra parcialmente escondido, está unido a la Lys-679 del dominio C-terminal (69).

El glucógeno forma una hélice arrollada a la izquierda, con 6,5 restos de glucosa por vuelta (figura 22). En la superficie del monómero de fosforilasa, existe una larga hendidura de aproximadamente 30 Å que tiene el mismo radio de curvatura que el glucógeno. Esta conecta con el centro de almacenamiento del glucógeno, que lo une con el centro activo, donde se fosforila. La hendidura tiene cabida para 4 o 5 residuos

de azúcar en cadena, pero es demasiado estrecha para admitir oligosacáridos ramificados. Ello explica claramente la incapacidad de la fosforilasa para romper restos glucosilo que se encuentran a menos de cinco unidades del punto de ramificación.

3.1.3. Piridoxal Fosfato: Coactivador esencial de GP

La GP contiene piridoxal fosfato (PLP) y lo necesita para su actividad. Este derivado de la vitamina B₆ está unido covalentemente a la Lisina-679 (Lys-679) de la GP por medio de una base de Schiff (figura 23). Se han realizado estudios extensos de la GP, utilizando análogos del PLP, en los cuales faltan o están modificadas distintas partes de la molécula (70, 71). Éstos indican que solamente el grupo fosfato del PLP participa en el proceso catalítico. En efecto, las estructuras de rayos-X revelan que sólo el grupo fosfato del PLP está cerca del centro activo de la GP (figura 23).

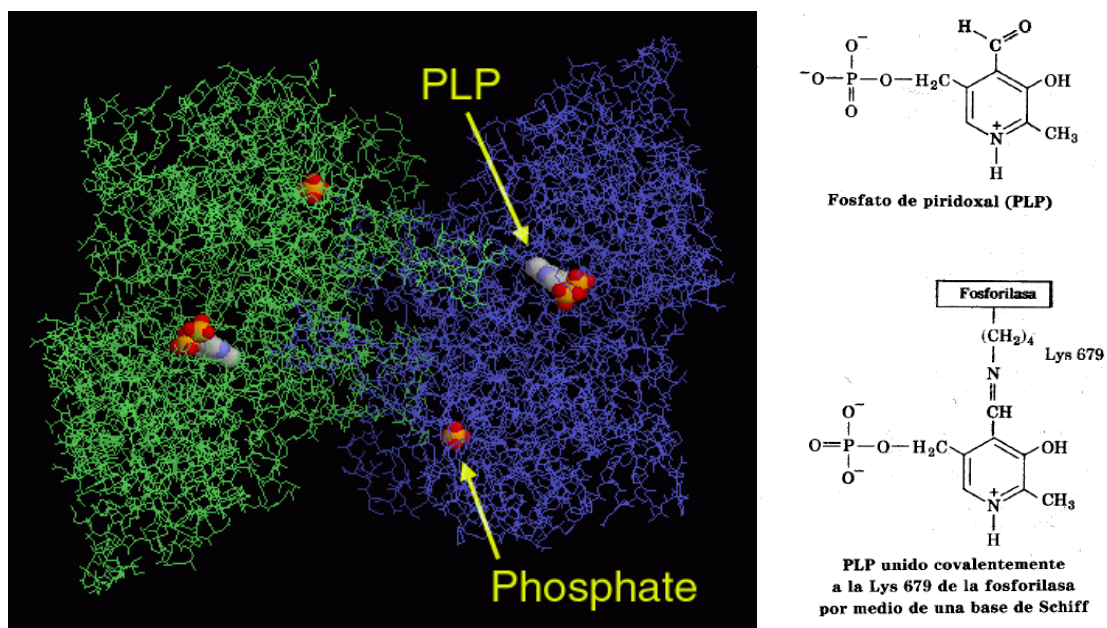


FIGURA 23. Estructura cristalina de la GP muscular de conejo analizada a través del programa informático RasMol. <http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol>. PLP: Piridoxal fosfato. A la derecha se muestra la estructura del Piridoxal fosfato y su unión con la GP en Lys-679.

Se cree que, en la GP, el grupo fosforilo del PLP actúa como un catalizador ácido-base general (figura 24). La GP se une primero a la unidad glucosilo terminal de la cadena de glucógeno en el extremo no reductor, así como a una molécula de ortofosfato que se encuentra entre el enlace α -1,4 y el resto de fosfato del PLP. Luego se separa el enlace α -1,4 y entonces se transfiere un protón del PLP indirectamente mediante el ortofosfato “libre” sobre el átomo de oxígeno en C4 de la glucosa que se libera. El glucógeno acortado en un resto se disocia, y se forma un intermediario reactivo con un ión oxonio en el centro activo. El ortofosfato ataca nucleofilicamente al

átomo C1 y forma, con una transferencia inversa de un protón sobre el PLP, el producto G-1-P.

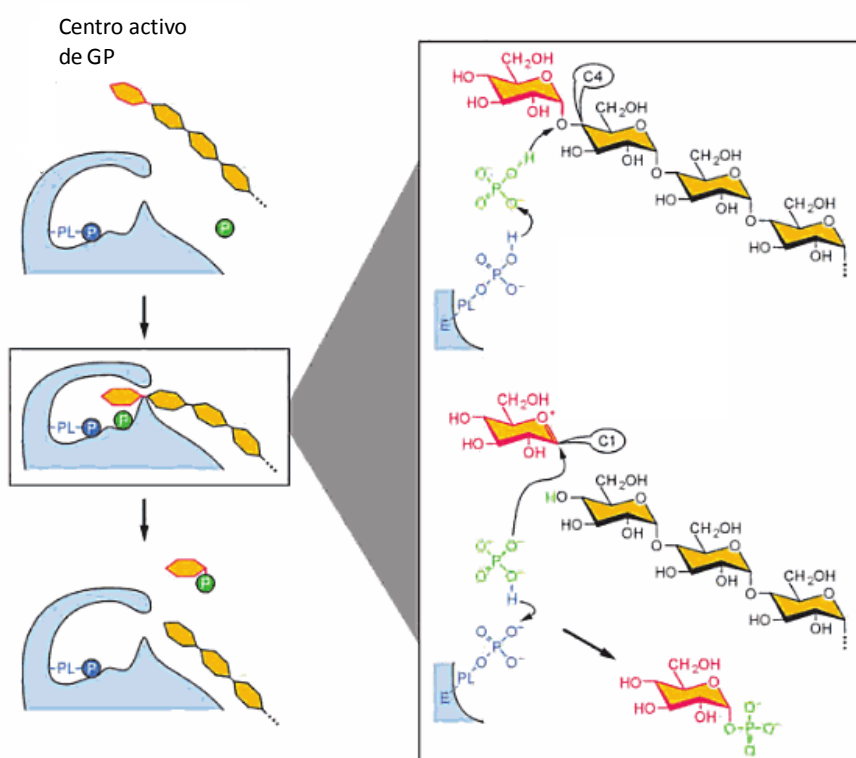


FIGURA 24. Mecanismo de reacción de GP (72). Esquema de la rotura (izquierda) y reacción detallada en el centro activo (derecha). El ataque del P_i tiene lugar en el lado del sustrato, donde se encuentra el C4 del grupo hidroxilo (cis); con ello se consigue mantener la conformación α de la glucosa-1-fosfato. PLP: piridoxal fosfato. E: enzima.

3.2. DEFICIENCIA DE LA GP MUSCULAR

3.2.1. Sintomatología

Se manifiesta con mialgia, fatiga prematura y rigidez o debilidad de los músculos utilizados, síntomas que disminuyen con el reposo. El comienzo de los síntomas se produce habitualmente en la infancia, si bien el diagnóstico se realiza en la segunda o tercera década de la vida debido a que los calambres y la mioglobinuria raramente se producen antes de los 10 años de edad. El diagnóstico después de los 50 años es raro.

Los síntomas aparecen cuando el paciente realiza dos tipos de ejercicio físico: por un lado, esfuerzos breves que requieren una contracción isométrica, como levantar o arrastrar objetos pesados, y, por otro, actividades dinámicas sostenidas, como andar cuesta arriba o subir escaleras. Los ejercicios moderados, como caminar en llano, suelen ser bien tolerados. Aunque los tipos de actividades estándar capaces

de provocar los síntomas, son los descritos en la mayoría de publicaciones, hay una gran variedad de ejercicio físico capaz de desencadenar los síntomas. Por ejemplo, los pacientes utilizan expresiones como “exprimir naranjas”, “secarse el cabello con un secador de mano”, “limpiar los cristales” o “fregar suelos”. El umbral de ejercicio tolerado varía de un paciente a otro, y también el tipo de actividad que es tolerada en un mismo paciente a lo largo de la historia natural de la enfermedad.

3.2.2. El fenómeno de “second wind”

Algunos pacientes refieren una mejoría de sus molestias si disminuyen el umbral de actividad física o hacen un breve descanso al aparecer los primeros síntomas, este fenómeno es conocido como “second wind”, fase de segunda entrada, y permite al paciente continuar el ejercicio durante más tiempo. El fenómeno de *second wind* representaría un mecanismo de adaptación del músculo a su incapacidad para usar el glucógeno muscular y la puesta en marcha de vías alternativas de obtención de energía auxiliar, entre las que se incluyen el consumo de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos.

Cuando el paciente excede el umbral de ejercicio que le permite la enfermedad, sufre calambres dolorosos que pueden llegar a producir mioglobinuria (alrededor de la mitad de los pacientes), pudiendo causar fallo renal si las crisis son graves.

3.2.3. Formas clínicas atípicas de la enfermedad

Hay formas graves con debut en el período neonatal (Forma Infantil Fatal) que cursan con hipotonía generalizada, insuficiencia respiratoria y muerte súbita (73). En otros casos, también de inicio en edades tempranas de la vida, el cuadro clínico incluye la presencia de retraso psicomotor y una moderada debilidad muscular proximal (74). Otras manifestaciones atípicas de debut o complicaciones descritas en la literatura incluyen: dolor torácico atípico, gota e hiperuricemia, disfunción masticatoria, formas mioglobinúricas, formas hiperCKémicas y tipo Distrofia Muscular de cinturas (LGMD), entre otras.

3.3. CARACTERÍSTICAS

3.3.1. Histología

En la biopsia muscular, mediante *microscopia óptica y electrónica*, puede observarse la presencia de vacuolas subsarcolémicas e intermiofibrilares repletas de glucógeno que pueden ser detectadas en la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS). Estos depósitos subsarcolemales de glucógeno suelen encontrarse en la periferia de las

fibras, aunque a veces pueden pasar inadvertidos. En ocasiones, pueden observarse alteraciones en las mitocondrias, en el retículo sarcoplásmico y en las fibras tipo 1.

Existe una *reacción histoquímica* para la fosforilasa muscular descrita por Takeuchi y Kuriaki (75), que se fundamenta en la elongación de las cadenas periféricas del glucógeno endógeno en presencia de glucosa-1-fosfato. En la mayoría de los pacientes no se produce tinción en la fibra muscular, sin embargo la tinción es normal en el músculo liso vascular: en una biopsia de un paciente de McArdle, las fibras musculares no se tiñen con la tinción de miofosforilasa pero si las fibras lisas de los vasos.

Hay casos en los que se observado una tinción positiva equívoca, o falso positivo, debida a la aparición de fibras regenerativas: la reacción histoquímica se produce porque este tipo de fibras musculares inmaduras expresa una isoenzima distinta a la isoenzima de fosforilasa del músculo maduro, denominada *Forma Fetal*, aunque en estos casos la tinción positiva para GP muscular suele observarse en fibras que se encuentran dispersadas entre otras fibras con ausencia de tinción. Esta situación es más probable cuando la biopsia se practica tras un episodio de mioglobulinuria, cuando la regeneración es muy activa (76).

3.3.2. Bioquímica

A. Creatín Quinasa

En el laboratorio, la valoración en suero de la creatín quinasa, (CK), es un marcador inespecífico de la enfermedad. Además de su elevación tras un episodio de mioglobulinuria, esta enzima se encuentra elevada de forma persistente en la mayoría de los pacientes. Este dato permite aproximarse a un diagnóstico diferencial preliminar respecto a otras intolerancias metabólicas al ejercicio, como el déficit de Carnitil Palmitil Transferasa (CPT), dónde la CK sérica en periodos intercríticos se encuentra habitualmente dentro del intervalo de valores normales.

B. Prueba funcional de ejercicio en isquemia en el antebrazo

Fue introducida por Brian McArdle y se fundamenta en que cualquier bloqueo metabólico a lo largo de la vía glucogenolítica o glucolítica puede impedir la producción de lactato durante la realización de ejercicio en condiciones de isquemia.

Previo toma de una muestra de sangre en condiciones basales, la prueba consiste en situar un esfigmomanómetro en el antebrazo del paciente inflándolo por encima de la presión arterial; después el paciente debe apretar con su mano una esponja para que la aguja marque el máximo. Después de un minuto de ejercicio se desinfla y se obtienen muestras sanguíneas a los minutos 1, 3, 5 y 10.

En individuos normales se produce un incremento de las concentraciones de lactato en suero de 3 a 5 veces respecto a las basales en las primeras dos muestras, y luego disminuye hasta el valor basal. En los pacientes con enfermedad de McArdle no se produce aumento de lactato venoso *-curva plana-* (figura 25). Es una prueba funcional de gran ayuda diagnóstica, aunque no específica de la enfermedad. Existen factores que pueden afectarla como (i) la capacidad y buena voluntad del paciente para realizar ejercicio durante el tiempo necesario para estimular la ruta glucogenolítica, (ii) la variabilidad preanalítica de la determinación de lactato sérico: se requieren tubos de extracción especiales con inhibidores de la glucólisis eritrocitaria y una separación rápida del plasma.

Se han propuesto pruebas funcionales de ejercicio sin isquemia previa (77), siendo esta metodología muy útil para el diagnóstico de alteraciones en la glucólisis, sin producir las complicaciones que genera el test isquémico.

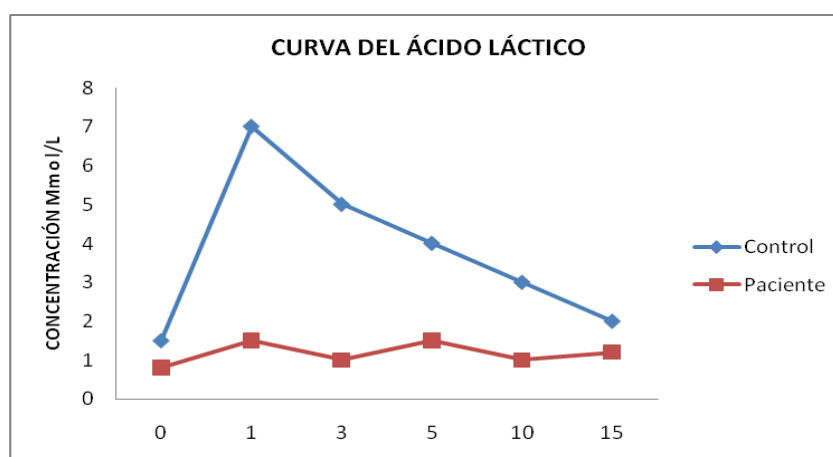


FIGURA 25. Curvas del ácido láctico tras una PAEI del antebrazo de un paciente con la enfermedad de McArdle y de un individuo control. Se puede observar como el paciente muestra una curva de ácido láctico plana.

3.4. GENÉTICA MOLECULAR

3.4.1. El gen *PYGM*

Este trastorno enzimático está causado por la herencia de las alteraciones moleculares en el gen que codifica para la miofosforilasa, *PYGM*. La enfermedad de McArdle se transmite de forma autosómica recesiva.

Se conocen tres isoenzimas humanas de la glucógeno fosforilasa: muscular, hepática y cerebral, codificadas por tres genes distintos. El gen de la miofosforilasa ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (11q13) (figura 26). El gen está formado por 20 exones separados por 19 intrones (78). La región codificante de la

glucógeno fosforilasa muscular del ser humano consta de 2.523 pares de bases y sus intrones tienen un tamaño que varía desde 83 pb del intrón 3 a las 3017 del 17.

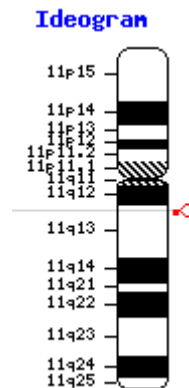


FIGURA 26. Cromosoma 11. Localización del gen PYGM (rojo). Mapa obtenido del NCBI.

El gen *PYGM* codifica para un transcrito de aproximadamente 3,4 Kb, pudiéndose estudiar únicamente en el tejido en el que se expresa la isoforma, el músculo esquelético maduro. La necesidad de biopsia muscular como muestra de partida para la obtención del ARNm de esta proteína, es una de las principales limitaciones para el estudio transcriptómico del gen.

3.4.2. Mutaciones

Los estudios moleculares han puesto de manifiesto una amplia heterogeneidad genética y, hasta la fecha, se han descrito 133 mutaciones (tabla III) que afectan en su mayoría a zonas codificadoras o exónicas, aunque también se han descrito alteraciones en zonas no codificantes (33, 79-84).

La enfermedad de McArdle se ha encontrado en diferentes grupos étnicos. Existen una serie de mutaciones denominadas privadas por presentarse específicamente en un determinado grupo poblacional. Así, la mutación más frecuente en pacientes de origen europeo y americano, es una mutación sin sentido en el exón 1 del gen, p.R50X; sin embargo, en Japón, donde jamás ha sido observada esta mutación, es muy común la mutación c.2128_2130del. Otras mutaciones probablemente privadas son: p.E541X en Finlandia; p.R576X, p.Q666E, p.G686R en Alemania (85, 86); p.L116P, p.N685Y y p.W798R en España (87).

Ex/Int	Codón	Secuencia	Cambio aminoacídico	Tipo Mutación	Cita bibliográfica
1	1	c.1A>C	p.M1L	SE	(27)
1	1	c.1A>G	p.M1V	SE	(88)
1	5	c.13_14delCT	p.L5VfsX22	Deleción	(89)
1	5	c.14delT	p.L5RfsX20	Deleción	(90)
1	16	c.46delGinsTT	p.V16FfsX12	Del/Ins	(91)
1	26/27	c.78_79delTG	p.E27AfsX50	Deleción	(92)
1	36	c.107T>G	p.L36R	SE	(93)
1	36	c.107T>C	p.L36P	SE	(94)
1	37	c.108_130del	p.H37QfsX33	Deleción	(95)
1	50	c.148C>T	p.R50X	Stop	(86)
1	51	c.152A>G	p.D51G	SE	(96)
1	53	c.158_160delACT	p.Y53del	Deleción	(96)
1	53	c.159C>G	p.Y53X	Stop	(97)
1	55	c.163_167del	p.A55GfsX21	Deleción	(98)
1	73	c.211_217dupCGCAGCA	p.Q73HfsX7	Duplicación	(33)
1	75	c.225C>T	p.Y75X	Stop	(96)
2	83	c.247A>T	p.I83F	SE	(33)
2	85	c.255C>A	p.Y85X	Stop	(99)
2	94	c.280C>T	p.R94W	SE	(99)
2	102	c.304delA	p.N102TfsX4	Deleción	(81)
2	114	c.341delA	p.Y114SfsX181	Deleción	(96)
3	116	c.347T>C	p.L116P	SE	(85)
3	125	c.373G>T	p.E125X	Stop	(100)
3	134	c.402delC	p.N134KfsX161	Deleción	(33)
3	136	c.407G>A	p.G136D	SE	(80)
3	139	c.415C>T	p.R139W	SE	(101)
4	153	c.458T>G	p.L153R	SE	(98)
4	157	c.470G>T	p.G157V	SE	(82)
4	159	c.475G>A	p.G159R	SE	(81)
4	161	c.481C>T	p.R161C	SE	(82)
4	170/171	c.509_511delAGA	p.delK170_171	Deleción	(80)
4	174	C.521G>A	p.G174D	SE	(33)
5	194	c.580C>T	p.R194W	SE	(102)
5	205	c.613G>A	p.G205S	SE	(86)
5	205	c.614G>A	p.G205D	SE	(103)
5	215	c.645G>A	-	Desconocido	(104)
6	230	c.689C>G	p.P230R	SE	(81)
6	239	c.715_717delGTC	p.V239del	Deleción	(81)
6	246	c.736T>C	p.S246P	SE	(105)
7	270	c.808C>T	p.R270X	Stop	(106)
8	292	c.875T>C	p.L292P	SE	(107)
8	298	c.892_893ins	p.Y298LfsX35	Ins	(108)

8	337	c.1010A>G	p.Q337R	SE	(82)
9	349	c.1045G>A	p.E349K	SE	(100)
9	354	c.1061T>C	p.L354P	SE	(109)
9	362	c.1086G>A	p.W362X	Stop	(110)
10	365	c.1094C>T	p.A365V	SE	(81), (33)
10	379	c.1136C>T	p.T379M	SE	(80)
10	384	c.1147G>A	P.E383K	SE	(82)
10	384	c.1151C>A	p.A384D	SE	(81)
10	385	c.1155_1156delGG	p.E386AfsX89	Delección	(82)
10	388/390	c.1162_1169del TGGCCGGTinsA	p.W388SfsX34	Del/Ins	(111)
10	397	c.1190T>C	p.L397P	SE	(27)
10	398	c.1193C>T	p.P398L	SE	(96)
11	428	c.1282C>T	p.R428C	SE	(81)
11	449	c.1345G>C	p.G449R	SE	(80)
11	450	c.1349C>T	p.S450L	SE	(82)
11	453	c.1354insC	p.A453RfsX22	Inserción	(82)
11	454	c.1361_1393del	p.N454_L464del	Delección	(112)
11	455	c.1363G>C	p.G455R	SE	(113)
11	456	c.1366G>A	p.V456M	SE	(114)
12	486	c.1458G>A	p.G486D	SE	(82)
12	488	c.1463C>A	p.T488N	SE	(115)
12	488	c.1463C>T	p.T488I	SE	(80)
12	489	c.1466C>G	p.P489R	SE	(94)
12	490	c.1469G>A	p.R490Q	SE	(80)
12	490	c.1366G>A	p.R490W	SE	(33)
12	491	c.1471C>T	p.R491C	SE	(81)
12	491	c.1470dupG	p.R491AfsX7	Duplicación	(33)
12	492	c.1475G>A	p.W492X	Stop	(81)
12	494	c.1480delG	p.V494FfsX45	Delección	(116)
13	511	c.1531delG	p.D511TfsX28	Delección	(117)
13	523	c.1569C>G	p.L23L	Desconocido	(94)
13	534	c.1601delA	p.D534VfsX5	Delección	(100)
14	541	c.1621G>T	p.E541X	Stop	(118)
14	543	c.1627A>T	p.K543X	Stop	(81)
14	543	c.1628A>C	p.K543T	SE	(86)
14	570	c.1709G>A	p.R570Q	SE	(80)
14	570	c.1708C>T	p.R570W	SE	(82)
14	574	c.1722 T>G	p.Y574X	Stop	(119)
14	575	c.1725A>G	p.K575E	SE	(82)
14	576	c.1726C>T	p.R576X	Stop	(88)
14	577	c.1730A>G	p.Q577R	SE	(33)
14	587	c.1760T>C	p.L587P	SE	(120)
14	590	c.1769G>A	p.R590H	SE	(80)

15	599	c.1797delT	p.F599LfsX6	Delección	(101)
15	602	c.1804C>T	p.R602W	SE	(100)
15	602	c.1805G>A	p.R602Q	SE	(121)
15	609	c.1827G>A	-	<i>Splicing</i>	(119)
16	648	c.1942A>T	p.N648Y	SE	(96)
16	650	c.1948del	p.R650EfsX8	Delección	(122)
16	650	c.1948C>T	p.R650X	Stop	(82), (80)
16	655	c.1963G>A	p.E655K	SE	(27)
17	657/726	c.1970_2177del	p.V657_G726del	Delección	(81)
17	660	c.1979C>A	p.A660D	SE	(123)
17	662	c.1985A>C	p.D662A	SE	(98)
17	666	c.1996C>G	p.Q666E	SE	(88)
17	670	c.2009C>T	p.A670V	SE	(124)
17	685	c.2053A>T	p.N685Y	SE	(125)
17	686	c.2056G>A	p.G686R	SE	(88)
17	686	c.2056G>C	p.G686R	SE	(126)
17	687	c.2059G>C	p.A687P	SE	(127)
17	692	c.2075_2076delCCinsAAA	p.T692KfsX30	Del/Ins	(128)
17	704	c.2111C>T	p.A704V	SE	(100)
17	705	c.2113_2114delGG	p.G705RfsX16	Delección	(81)
17	710	c.2128_2130delTTC	p.F710del	Delección	(107)
18	715	c.2143C>T	p.R715W	SE	(80)
18	754	c.2262delA	p.K754NfsX49	Delección	(129)
18	755	c.2263C>T	p.Q755X	Stop	(100)
19	771	c.2312G>A	p.R771Q	SE	(130)
19	779	c.2337_2339delAGA	p.779delE	Delección	(131)
19	784	c.2352C>A	p.C784X	Stop	(33)
19	785	c.2353C>T	p.Q785X	Stop	(98)
20	795/796	c.2385_2386delAA	p.E797VfsX18	Delección	(102)
20	798	c.2392T>C	p.W798R	SE	(87), (132)
20	808	c.2422A>C	p.T808P	SE	(133)
20	809	c.2425InsT	p.S809FfsX6	Ins	(134)
20	814	c.2441G>A	p.S814N	SE	(135)
20	815	c.2444A>C	p.D815A	SE	(81)
20	822	c.2465C>A	p.A822D	SE	(94)
20	826	c.2477G>C	p.W826S	SE	(81)
Int 3	-	c.425-26a>g	p.C143DfsX5	Delección	(136)
Int 4	-	c.529-8g>a	p.Q176_M177insVQ	<i>Splicing</i>	(137)
Int 5	-	c.856-601g>a		Ins	(136)
Int 6	-	c.772 -2a>t	-	Desconocido	(82)
Int.6	-	c.772-5c>t	-	Desconocido	(94)
Int. 7	-	c.855 +1g>c	-	Desconocido	(81)
Int.8	-	c.999 + 20c>t	-	<i>Splicing/NMD?</i>	(94)

Int. 9	-	c.1092 +1g>a	-	Desconocido	(81)
Int. 9	-	c.1093 -1g>t	-	Desconocido	(81)
Int. 10	-	c.1239 +1g>a	-	Desconocido	(81)
Int. 14	-	c.1768 +1g>a	p.V568AfsX16	Splicing	(107)
Int. 16	-	c.(1969+214)_(2177+369)del	p.V657_G726del	Delección	(138)
Int 18	-	c.2312 +3g>c	-	Desconocido	(80)
Int. 19	-	c.2380 -1g>a	-	Desconocido	(81)

TABLA III. Mutaciones en el gen *PYGM* de pacientes con la enfermedad de McArdle, descritas hasta la fecha. *Ex/Int*; *Exón/Intrón*, *Del/Ins*; *Delección/Inserción*, *SE*; *Mutación con cambio de aminoácido*, *Stop*; *Mutación terminadora*, *Splicing*; *corte y empalme de exones*.

En nuestro país las mutaciones más frecuentes son: p.R50X, p.G205S y p.W798R. La mutación p.R50X es la alteración molecular más común entre los pacientes españoles, es una mutación sin sentido que provoca la aparición de un codon prematuro de terminación (PTC), debida al cambio c.148C>T. Las otras dos mutaciones más prevalentes en los pacientes españoles son la p.W798R y p.G205S, respectivamente. La mutación p.W798R únicamente se ha encontrado, hasta ahora, en la población española (mutación privada). Es una mutación de “sentido equivocado” (*missense*), cuyo cambio (c.2392T>C) afecta al extremo C-terminal de la proteína, produciendo la modificación de un triptófano por una arginina lo que altera la polaridad de dicha región. Finalmente, encontramos otra mutación de “sentido equivocado”, p.G205S (c.613G>A), que afecta a un dominio de la proteína implicado en la unión al glucógeno y a la tetramerización de la enzima (85).

Siguiendo un esquema de trabajo realizado a partir de un estudio realizado por nuestro grupo (139), es posible caracterizar en sangre hasta el 60% de los alelos que portan mutaciones en pacientes susceptibles de padecer la enfermedad de McArdle. Dicho esquema consiste en el cribado mutacional por reacción en cadena de la polimerasa, PCR, y posterior análisis con enzimas de restricción, RFLP, de las tres mutaciones más comunes en la población española a partir de ADN genómico extraído de sangre. Añadiendo a este cribado por PCR- RFLP la secuenciación de los exones 1, 14, 17 y 18, que son los que presentan mayor incidencia de mutaciones el porcentaje de mutaciones se puede llegar a la tipificación molecular del 76% de los alelos (figura 27).

Esta miopatía metabólica se considera heredada de forma autosómica recesiva, por lo que genéticamente puede ocurrir que: 1) el paciente sea homocigoto mutante; 2) sea heterocigoto compuesto, es decir, cada alelo porte una mutación distinta; 3) alguna de las alteraciones genómicas identificadas esté localizada en una región no conservada, intrón, o que sea, un polimorfismo supuesto neutro, y 4) que el paciente sea “heterocigoto manifiesto”, termino descrito por algunos autores para designar

pacientes en los cuales sólo se ha hallado una mutación patogénica en estado de heterocigosis pero que poseen un cuadro clínico típico de enfermedad de McArdle, incluyendo curva plana para el lactato tras la prueba de isquemia, una tinción histoquímica en músculo positiva para la miofosforilasa y actividad indetectable o mínima de la enzima en músculo esquelético. En los supuestos 3 y 4, los estudios de expresión y transcriptómicos del gen *PYGM* pueden ayudar a esclarecer la alteración molecular subyacente. El estudio de las alteraciones durante el procesamiento del ARNm forma parte de la caracterización genética para estudiar mutaciones que en ADN genómico pueden pasar desapercibidas; con el objeto de demostrar la patogenicidad de ciertas mutaciones que ocurren en regiones no codificantes o de polimorfismos génicos localizados en los exones del gen *PYGM* y que en principio son considerados como silentes (140).

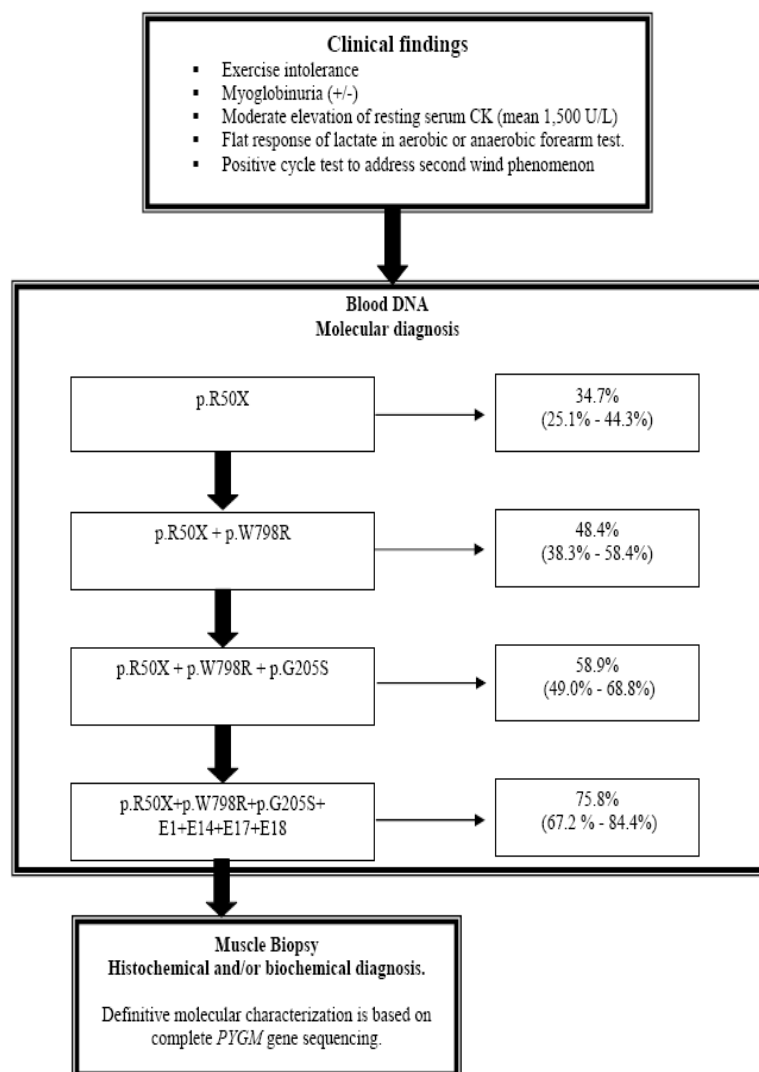


FIGURA 27. Esquema para el diagnóstico en sangre de la enfermedad de McArdle (13). (+/-) indica la presencia o la ausencia del rasgo particular clínico. A la derecha aparece el porcentaje de pacientes a los que se les identificó ambos alelos en cada paso. E: exón.

3.4.3. Estudios transcriptómicos

3.4.3.1. NMD y el gen PYGM

La mutación más frecuentemente encontrada en el gen *PYGM*, en la población caucásica, es la p.R50X que genera un codon prematuro de terminación (PTC) en el exón 1. Cerca del 35% del resto de mutaciones identificadas en el este gen producen PTCs (141). Estas son producidas por cambios nucleotídicos (mutaciones *nonsense*), deleciones, inserciones o mutaciones que afectan al correcto procesamiento de los transcritos o *splicing*. La introducción de PTCs de forma tan prematura puede tener multitud de consecuencias, incluyendo el corte incorrecto o *skipping* de exones, que puede restablecer la fase generando una proteína más pequeña, o bien la disminución de la estabilidad del ARNm portador del PTC (142).

Este mecanismo celular que elimina los ARNm portadores de estos cambios es conocido como NMD del inglés "*nonsense-mediated decay*" y protegería al organismo frente al efecto deletéreo de proteínas truncadas que tuvieran un efecto negativo dominante o de ganancia de función, además de ser un proceso crítico en el desarrollo celular. Esto explicaría por qué las alteraciones asociadas a los codones *nonsense* producen una caída en los niveles de expresión del ARNm que las portan (143, 144). Este sistema degrada, en general, transcritos que presentan PTC localizados a 50-55 nucleótidos corriente arriba de una unión de *splicing* que es reconocida por un sistema proteico denominado EJC (del inglés "*exón junction complex*"), el cual está formado por 12 proteínas. Cuando el ribosoma comienza la traducción y encuentra un PTC, éste se detiene, lo que permite la formación del complejo SURF, el cual cuando colisiona con el EJC provoca la activación del sistema NMD y con ello la degradación del ARNm (figura 28). Según esta regla, sólo las mutaciones PTC localizadas en el último exón no serían diana del NMD, sin embargo, entre un 5-25% de PTCs que cumplen la regla 50-55 escapan al mecanismo NMD, lo que podría generar proteínas truncadas con posible actividad residual. Este fenómeno se ha asociado a determinados genes (145-147) y también se ha observado en mutaciones "particulares" del gen de la miofosforilasa (141). Este mecanismo ha servido de base para terapias basadas en la inhibición del sistema NMD. De hecho se ha logrado recuperar el fenotipo normal "*in vitro*" en patologías como la enfermedad de Ullrich (148, 149).

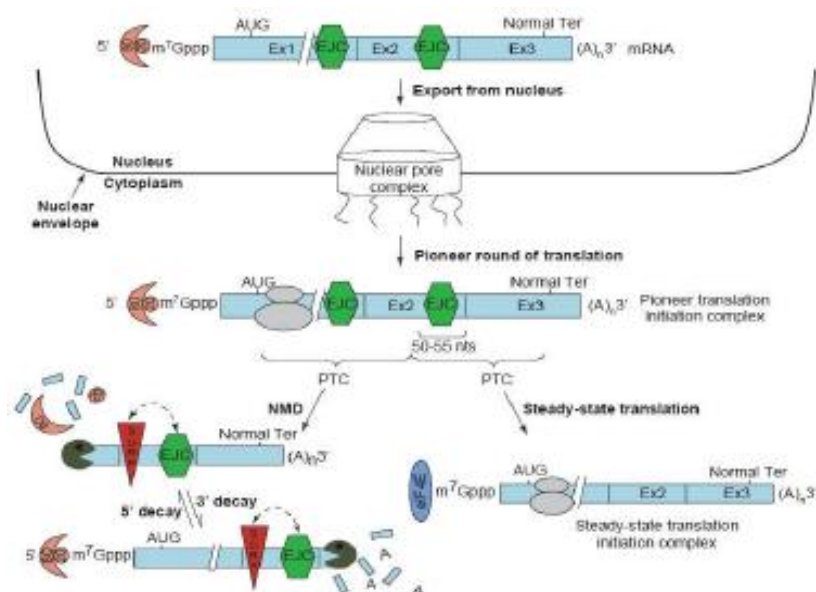


FIGURA 28. Esquema del mecanismo de actuación del sistema NMD (145). Se indica un PTC localizado antes de 50-55 nt “corriente arriba” de una unión exón-exón, que provocaría la activación del sistema NMD y otro localizado posteriormente que se traduciría normalmente. La eliminación de los intrones por el *splicing* da como resultado el posicionamiento a 20-25 nt corriente arriba de la unión exón-exón del complejo ECJ. SURF: complejo de vigilancia que se forma cuando se detiene el ribosoma al encontrar un PTC. Cuando SURF interacciona con EJC se dispara el sistema NMD.

Para confirmar si los correspondientes ARNm son sustrato del NMD o bien son resistentes a la degradación es necesario el análisis del perfil transcripcional mediante métodos cuantitativos de ARNm mediante PCR a Tiempo Real cuantitativa con sondas específicas del gen. En la PCR a tiempo real cuantitativa los transcritos son cuantificados mediante sondas que hibridan específicamente con los genes a estudiar (TaqMan®). Estas sondas permiten cuantificar los transcritos generados e incluso diseñando oligonucleótidos adecuados se puede cuantificar la cantidad relativa de transcritos normales y mutantes con respecto al gen control (150).

Otro tipo de mutaciones muy frecuentes son los cambios nucleotídicos que afectan al correcto procesamiento del ARNm o *splicing* (151). Aproximadamente un 15% de las mutaciones puntuales asociadas a enfermedades genéticas humanas afectan a este proceso (152, 153). Estas mutaciones pueden afectar a secuencias conservadas implicadas en el *splicing* (sitio donador 5' de *splicing*, sitio aceptor 3' de *splicing* y el tracto polipirimidínico) que representan el 60% de estas mutaciones (154), o bien afectar a secuencias reguladoras (155, 156). Estas secuencias reguladoras, que participan tanto en el *splicing* constitutivo como en el alternativo, se encuentran localizadas tanto en exones como en intrones, pueden actuar o bien estimulando la eliminación intrónica, potenciadores de *splicing* o *enhancers* (ESEs e ISEs) o bien impidiéndola, silenciadores de *splicing* (ESSs e ISSs) (157). Las secuencias conservadas son reconocidas por las partículas ribonucleoproteicas (snRNPs) (U1, U2, U4, U5 y U6)

que forman el “*spliceosoma*” junto con más de 50 proteínas, y los elementos reguladores de *splicing* ejercen su acción a través de factores proteicos. En concreto, las secuencias silenciadoras parecen interactuar con una serie de reguladores negativos, en su mayoría pertenecientes a la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs).

Los *enhancers* exónicos de *splicing* (ESEs) son sitios de unión de factores proteicos ricos en serina y arginina, conocidos como proteínas SR, a través de los cuales realizan su función activadora (158). Las proteínas SR son capaces de unirse a los ESEs, estabilizando las interacciones de U1-snRNP con el extremo 5' y de U2AF con el 3', permitiendo el reclutamiento del complejo U4/U6·U5-tri-snRNP (159). En cambio, las proteínas hnRNPs reconocen a los ESSs y ejercen una función antagónica, pues mientras hnRNP-A1 favorece el uso del sitio 5'distal, SF2/ASF promueve la utilización del ss 5'proximal (160) (figura 29).

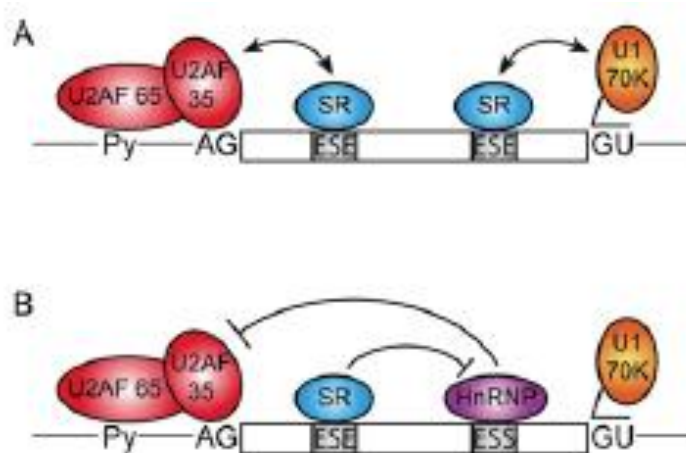


FIGURA 29. Papel de las proteínas SR y hnRNP en la selección del sitio de *splicing*. A. Las proteínas SR unidas a los ESE favorecen la acción de las proteínas U2AF y U1-70K en sus correspondientes sitios de *splicing*. B. Las proteínas hnRNP son reclutadas a los ESS ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el *splicing*, que puede ser superado por la presencia de proteínas SR (adaptado de Long y Cáceres (161)).

Las proteínas SR también juegan un papel relevante en funciones post-*splicing*, como transporte del ARNm, degradación vía NMD y traducción, gracias a que algunas de ellas, como SF2/ASF, SRp20 y 9G8, pueden moverse entre el núcleo y el citoplasma.

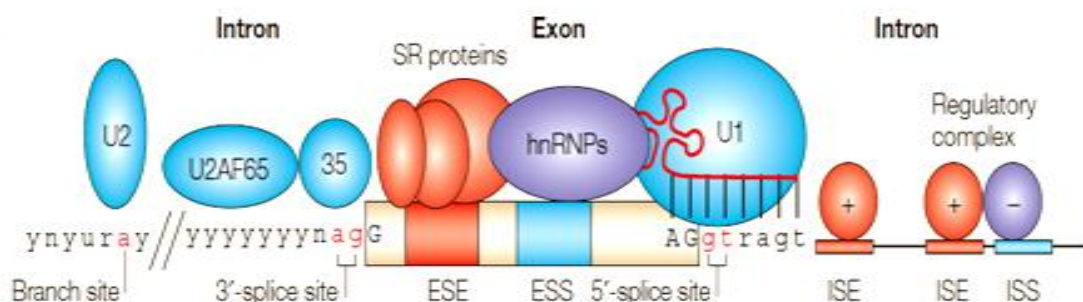


FIGURA 30. Representación esquemática de las secuencias, proteínas y factores que intervienen en el proceso de *splicing*. Las señales esenciales de *splicing* que definen las uniones entre exones son relativamente cortas. Sólo los dinucleótidos GU y AG que directamente flanquean los exones (en el 3' y en el 5', respectivamente) y la adenosina del punto de ramificación (en rojo) están siempre conservados. En la mayoría de los casos existe un tracto polipirimidínico de longitud variable (el símbolo consenso “ γ ” representa una base pirimidínica, citosina o timina) secuencia arriba del sitio 3' de *splicing*. El punto de ramificación está típicamente localizado entre 18 y 40 nucleótidos del tracto polipirimidínico, en dirección 3'. Los componentes de la maquinaria basal de *splicing* se unen a las secuencias consenso y promueven el ensamblaje del complejo de *splicing* (162).

La identificación de las secuencias consenso de unión para factores reguladores de *splicing* (proteínas SR) ha permitido la generación de diferentes programas bioinformáticos como el ESEfinder (<http://exon.cshl.edu/ESE/>) (163), SELEX, RESCUE-ESE y PESX (164) mediante los cuales se pueden predecir los posibles ESEs de una secuencia nucleotídica a estudiar (165). Estos programas facilitan la identificación de posibles ESEs o SSEs, basándose en el reconocimiento de cuatro proteínas SR: SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55, cuyos motivos consenso de unión se muestran en la figura 31.



FIGURA 31. Motivos de unión para las proteínas SR SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55. La altura de cada letra indica la frecuencia de cada nucleótido en esa posición. En cada posición, los nucleótidos se muestran de arriba a abajo en orden decreciente de frecuencia. Las letras en color naranja indican frecuencias por encima del fondo. <http://exon.cshl.edu/ESE/>

En los últimos años se ha descubierto un mayor número de mutaciones asociadas a enfermedad que afectan a secuencias reguladoras de *splicing* como en la fibrosis quística, distrofia miotónica, esclerosis múltiple y otras (156, 158), incluso se han definido ciertas mutaciones puntuales que afectan a secuencias reguladoras de

splicing y en concreto a ESEs (*exonic splicing enhancers*), y que fueron incorrectamente clasificadas como mutaciones de cambio de aminoácido, mutaciones *nonsense* o incluso polimorfismos silenciosos debido a la ausencia de análisis a nivel de ADNc (166); las variantes genómicas (VGs), mutación formada por una simple sustitución o por pequeñas inserciones o deleciones, identificadas en el ADN genómico (ADNg) durante el análisis de un gen asociado a una enfermedad, han de ser estudiadas ya que sus implicaciones funcionales pueden no ser evidentes; este sería el caso de VGs que no provocan cambios en la secuencia de la proteína (denominadas silentes), como son los polimorfismos, o las mutaciones intrónicas. Sin embargo, los últimos datos muestran que las VGs silentes pueden afectar, por ejemplo, al mecanismo de *splicing* y que a menudo pueden ser la causa de varias enfermedades (162).

Las dos consecuencias más comunes de las mutaciones implicadas en el correcto corte y empalme de zonas exónicas e intrónicas son el corte incorrecto, *skipping*, de un exón, eliminación de un exón que no se incluye en el ARNm maduro, y la activación de sitios crípticos cuya consecuencia es la inclusión de secuencias aberrantes o la eliminación de secuencias codificantes. Además, en los intrones existen de manera muy abundante secuencias que portan todos los elementos necesarios para el reconocimiento de la maquinaria de *splicing* pero no se incluyen como exones en el ARNm. Esto es debido, a que a pesar de que estas secuencias poseen buenos valores de *splicing* presentan otros defectos importantes en las regiones potenciadoras del *splicing*, además de un enriquecimiento de regiones silenciadoras que impiden su reconocimiento como exones verdaderos (167). Estas secuencias son denominadas pseudoexones. En los últimos años se han caracterizado diversas enfermedades genéticas causadas por la inclusión de estas secuencias, generalmente debido a mutaciones que provocan la creación *de novo* de un sitio donador o aceptor potente de *splicing* seguido de una selección de un aceptor o donador “oportunista” (168-171). Otro motivo por el que estas secuencias pueden ser incluidas como exones es debido a la existencia de mutaciones que causan la creación o delección de secuencias reguladoras de *splicing* (*enhancer* o secuencias silenciadoras tanto exónicas como intrónicas) (151, 157, 172). La mayoría de las mutaciones de *splicing* producen un cambio en el marco de lectura dando lugar a una secuencia madura de ARNm con un codón prematuro de terminación (PTC) lejano al sitio original. *A priori*, todas ellas son clasificadas como mutaciones nulas, ya que generalmente dan lugar a la disminución de los correspondientes ARNms evitándose la síntesis de proteínas truncadas (173) mediante NMD. Sin embargo, es necesario validar el efecto que ejercen las variantes de secuencia intrónicas y exónicas sobre el procesamiento del ARNm, utilizando aproximaciones experimentales que impliquen la expresión de regiones discretas del ADN genómico, bien realizando clonaje o bien utilizando sistemas celulares “modelo de *splicing*” llamados minigenes con los vectores apropiados. Estas aproximaciones pueden ser utilizadas como herramienta para distintos estudios como son la

determinación del grado de reconocimiento de los sitios de *splicing*, la identificación de elementos exónicos o intrónicos que activan o reprimen al *splicing*, la identificación de variante alélicas que tienen un efecto en la eficiencia del *splicing* y la identificación de elementos requeridos para la regulación por factores específicos. El conocimiento de las consecuencias que cada mutación produce en términos de su mecanismo de acción a nivel de ADN y ARNm ha abierto nuevas y prometedoras vías terapéuticas genéticas en estas alteraciones del *splicing* (174).

En los últimos años los oligonucleótidos antisentido tipo morfolino (AMOs), capaces de bloquear alostéricamente estos sitios de *splicing*, han sido utilizados para restaurar el *splicing* normal en varias enfermedades como la β -talasemias (175), fibrosis quística (176), enfermedad de Menkes (177), albinismo ocular tipo I (178), afibrinogenia (179), distrofia muscular de Duchenne (180), ataxia telangiectasia (181). La compañía PTC Therapeutics Inc. ha producido el compuesto PTC124, un agente antibiótico inductor de la supresión de terminación y administrable por vía oral, que ha sido designado como fármaco huérfano para el tratamiento de la DMD en 2005, y con el que se inició un ensayo clínico de Fase II en pacientes. El PTC124 tiene alta permeabilidad sin efectos secundarios tóxicos, parece tener más eficiencia de supresión de terminación que la gentamicina y existen evidencias de que puede actuar preferencialmente en los codones de terminación prematuros pero no en los de terminación natural (182).

3.4.3.2. Relación genotipo-fenotipo

En numerosas enfermedades genéticas, con el conocimiento del espectro mutacional de los genes implicados y teniendo en cuenta la naturaleza de las mutaciones identificadas, la información obtenida en los diferentes estudios de expresión de los alelos mutantes y los datos clínicos y bioquímicos de los pacientes se ha intentado correlacionar el fenotipo con el genotipo para poder predecir, en base a los cambios nucleotídicos, la evolución de los pacientes y así poder adecuar una terapia de forma más individualizada y en algunos casos más dirigida al mecanismo molecular responsable de la patogénesis en cada variante alélica.

Los pacientes con GSD V presentan una gran homogeneidad bioquímica, casi todos ellos muestran actividad indetectable de miofosforilasa (183), sin embargo muestran variabilidad clínica y genética. Se ha intentado determinar si existen otro tipo de variables que puedan explicar la heterogeneidad clínica de esta patología. Una de ellas ha sido la posible correlación genotipo-fenotipo. En las series de pacientes estudiadas hasta el momento, no parece existir ninguna relación entre la gravedad clínica y el genotipo (9, 80, 82, 100, 184). Es decir, genotipos idénticos cursan con manifestaciones clínicas diferentes (185), que van desde los prácticamente

asintomáticos hasta aquellos con mialgias severas, mioglobinuria y/o debilidad o atrofia muscular. En este sentido la mutación p.R50X se ha descrito en pacientes con forma típica de McArdle, forma de inicio infantil y una forma infantil fatal.

A pesar de que una gran parte de pacientes muestran un cuadro clínico relativamente homogéneo, existe gran variabilidad en el fenotipo clínico de los pacientes con enfermedad de McArdle, desde aquellos que son asintomáticos (diagnosticados por tener algún familiar afecto) hasta aquellos que muestran una intolerancia extrema al ejercicio. En este sentido se han descrito 9 casos de inicio tardío, sin ningún tipo de síntoma durante la mayor parte de la vida (31) y se han documentado al menos 3 casos de una forma infantil fatal de la enfermedad (73, 186, 187).

Por otra parte, se han publicado alteraciones metabólicas asociadas o en concurrencia con la enfermedad de McArdle, hecho conocido comúnmente como “doble problema”. Así, existen casos de déficit asociado con mioadenilato desaminasa (188, 189), con enfermedades mitocondriales (114, 190), con hipertermia maligna (191), y con miastenia gravis (192).

Actualmente se piensa que las variantes genéticas de ciertos genes relacionados con la función muscular y/o que influyen en la capacidad de ejercicio (*ACE* y *AMPD1* entre otros), podrían actuar como modificadores de la expresión fenotípica de la enfermedad (193). En este sentido, tan sólo se ha encontrado una asociación entre el polimorfismo de inserción/delección (I/D) del gen *ACE* y el grado de afectación clínica de la enfermedad de McArdle, lo que podría explicar en cierta medida la variabilidad clínica de la enfermedad (194).

Aunque parece que otras variables como la edad y el sexo, pueden afectar al fenotipo clínico de la enfermedad (32), es el sexo, según un estudio reciente, el que parece tener un efecto modificador en los pacientes con la enfermedad de McArdle, siendo el grado de afectación clínica significativamente mayor en las mujeres que en los hombres. Más aún, la mutación c.34C>T del gen *AMPD1*, que codifica para la isoforma específica muscular de la enzima AMP desaminasa (MADA), ejercería un efecto modulador en las mujeres con enfermedad de McArdle reduciendo su capacidad aeróbica submáxima (194, 195).

En cualquier caso, las discrepancias observadas entre el genotipo mutante y la manifestación fenotípica de las enfermedades genéticas ilustran la idea, cada vez más aceptada en distintas enfermedades monogénicas, de que la expresión del producto de un *locus* principal no es el único factor responsable de la manifestación del fenotipo metabólico, sino que existen múltiples factores, tanto genéticos (diferencias intertisulares e interindividuales en la expresión génica de genes implicados en *splicing*, NMD, etc.) como epigenéticos y ambientales, que afectan al fenotipo

metabólico y que demuestran el carácter complejo también de los defectos monogénicos (196-198).

3.4.4. Tratamiento de la enfermedad de McArdle

No existe un tratamiento “curativo” de la enfermedad, aunque se puede hablar de soluciones paliativas que permitan mejorar la sintomatología clínica de los pacientes.

A pesar del amplio conocimiento de la fisiopatología y genética de la enfermedad de McArdle, se han conseguido aún pocos avances a nivel terapéutico, la mayoría centrados en la ingestión oral de sacarosa previa al ejercicio y el propio entrenamiento físico (199). Los tratamientos encaminados a mejorar la disponibilidad de sustratos que permitan mejorar la tolerancia al ejercicio han mostrado un efecto limitado (200).

3.4.4.1. Tratamientos farmacológicos y nutricionales

- a. Creatina monohidrato.** Su ingesta mejora la capacidad muscular en el entrenamiento de resistencia (201). La administración de bajas dosis en un ensayo con 9 pacientes con enfermedad de McArdle, mostró una mejora en la capacidad de realización de ejercicio isquémico e isométrico (202), no proviniendo este efecto positivo de un aumento de los niveles de fosfocreatina muscular. En otro estudio de este grupo de investigadores, se valoró la ingesta de dosis más altas de creatina en 19 pacientes (203), los resultados indicaron un empeoramiento en la sintomatología de los pacientes induciéndose mialgia.
- b. Glucosa.** Se ha evaluado la ingesta oral antes de la práctica de ejercicio. El resultado de un ensayo en un grupo de 12 pacientes con la enfermedad, mostró una disminución del ritmo cardíaco máximo (204), lo cual puede ser una “terapia” útil cuando se prevé realizar un ejercicio vigoroso.
- c. Dietas de carbohidratos y proteínas.** Recientemente se determinó la tolerancia al ejercicio y la carga máxima de trabajo soportada en un cicloergómetro, en un grupo de 7 pacientes (205). La dieta rica en hidratos de carbono mostró un 25% de mejora en la capacidad oxidativa de trabajo máximo. Esta dieta también produjo un efecto preventivo frente a episodios de daño muscular causados por la enfermedad. En otro estudio con un único paciente de 9 años de edad, se demostró una recuperación en la tolerancia al ejercicio tras un año de seguimiento. Al paciente se le recomendó realizar las actividades físicas naturales de su edad, pero manteniendo una dieta pre-ejercicio (con 20 gramos de carbohidratos) con el objetivo de aumentar la glucosa sanguínea con

la ingestión de los carbohidratos (206). En cuanto a las dietas ricas en proteínas se han publicado algunos trabajos que reportan casos individuales. Uno de los estudios analizó una terapia basada en la combinación de ejercicio físico y una dieta rica en proteínas, aunque el entrenamiento aeróbico por sí mismo es capaz de mejorar la capacidad oxidativa y la resistencia en pacientes con McArdle (206-208).

- d. Sacarosa.** La sacarosa es el azúcar más abundante en la dieta y se metaboliza muy rápidamente a glucosa y fructosa tras su ingesta. En un estudio con 12 pacientes la toma de sacarosa mejoró notoriamente la tolerancia al ejercicio y disminuyó el riesgo de mioglobinuria (209). El tratamiento se considera eficaz únicamente durante el periodo habitual de aparición de los síntomas en este tipo de enfermos. El consumo exógeno de glucosa previo a la práctica de ejercicio junto con un programa de acondicionamiento físico parece ser un modelo de utilidad para pacientes con esta glucogenosis (210).
- e. Gentamicina.** Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan a nivel de ribosomas, han sido utilizados como agentes que evitan la lectura de los codones de terminación prematura, permitiendo la síntesis de proteínas de tamaño completo en enfermedades hereditarias, como la fibrosis quística (211). En los 4 pacientes estudiados portadores de la mutación, p.R50X, la administración de este fármaco no mejoró la sintomatología de los mismos (212).
- f. Vitamina B6.** Entre el 80-90% de la vitamina B6 (piridoxal fosfato) está unida a fosforilasa, pero este pool de vitamina B6 probablemente no es accesible metabólicamente. Existen pocos estudios relacionados con el uso de vitamina B6 y la enfermedad de McArdle. En uno de ellos, se indicó el beneficio causado por la suplementación con vitamina B6 (213).
- g. Ramipril.** Relacionado con el posible papel modulador de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el fenotipo de los pacientes con enfermedad de McArdle (214). La presencia del alelo I del gen ACE, se relaciona con una mayor capacidad física. Por tanto, el uso de inhibidores de la ECA como el Ramipril, podría teóricamente suponer una mejora de la capacidad física. Así se ha observado en pacientes con cardiomiopatía y en mujeres hipertensas (215), aunque la administración de este fármaco en 8 pacientes con enfermedad de McArdle no produjo cambios significativos en su fenotipo (216).

- h.** La administración de: D-ribosa, glucagón, aminoácidos de cadena ramificada y verapamil no han proporcionado ningún efecto beneficioso para los pacientes (217-221).

3.4.4.2. Entrenamiento aeróbico

Son numerosos los estudios que demuestran los efectos beneficiosos del entrenamiento físico en aquellas patologías relacionadas con una disminución significativa de la función muscular, como las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, el cáncer o el envejecimiento (222). Los pacientes con enfermedad de McArdle presentan una susceptibilidad a las complicaciones asociadas al esfuerzo, esta situación les hace adoptar comúnmente un estilo de vida sedentario. Este hecho, generalmente, reduce aún más su limitada capacidad oxidativa, aumentando su intolerancia al ejercicio (207). Durante los últimos años se ha estudiado el efecto del entrenamiento aeróbico en varios grupos de pacientes con esta enfermedad. Los resultados de estos trabajos indican que el ejercicio físico realizado en condiciones controladas puede practicarse de manera segura, siendo una opción terapéutica adicional que puede ayudar a normalizar el estilo y calidad de vida de los pacientes (223).

3.4.4.3. Terapia génica

Como en la gran mayoría de las enfermedades de carácter genético, la posibilidad de desarrollar un tratamiento definitivo, podría pasar por la terapia génica. Existen actualmente dos modelos naturales de enfermedad en animales, uno en vacas de raza *Charolais*, y otro en ovejas de raza *Merino* (224-226).

Se han realizado estudios experimentales en modelos ovinos y celulares, con adenovirus recombinantes que incluían el ADNc completo de la miofosforilasa, restaurándose parcialmente la actividad enzimática de miofosforilasa. Recientemente se han utilizado vectores de adenovirus modificados y virus adeno-asociados en un modelo ovino con enfermedad de McArdle, observándose expresión de miofosforilasa en fibras regenerativas (227, 228).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Genotipado e identificación de nuevas mutaciones en pacientes con déficit de GPM (enfermedad de McArdle) mediante el uso de ADN genómico.
2. Utilidad del análisis del ARN mensajero del gen *PYGM* en la caracterización del efecto molecular de mutaciones de significado patogénico incierto.
3. Demostración de la presencia de transcripción “ilegitima” del gen *PYGM* en tejidos extra-musculares.
4. Estudio comparativo de la estructura y expresión de los transcritos del gen *PYGM* entre el tejido funcional, músculo esquelético, y células blancas de sangre periférica.
5. Diseño de métodos genético-moleculares no invasivos basados en el mecanismo de transcripción ilegítima del gen *PYGM* con objeto de valorar su utilidad diagnóstica y en estudios de patogenicidad mutacional en pacientes con la enfermedad de McArdle.
6. Verificación de la expresión proteica de la isoenzima muscular de la glucógeno fosforilasa (GPM) en pacientes con enfermedad de McArdle y su relación con el genotipo.
7. Análisis de la expresión de las diferentes isoformas de GPM en pacientes y en controles.
8. Estudio proteico de la expresión diferencial en músculo esquelético de los genes subexpresados, *GYS1* y *ATP2A1*, en pacientes con la enfermedad de McArdle.
9. Análisis de colocalizaciones de GPM con las proteínas de músculo esquelético adulto codificadas por genes subexpresados, *GS* y *SERCA1*, e implicadas en el metabolismo muscular.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *SUJETOS*

La caracterización molecular de los pacientes con la enfermedad de McArdle se estableció mediante el estudio de dos tipos de individuos: pacientes y controles. Los sujetos control fueron elegidos con el criterio de ausencia de miopatía metabólica.

1.1. *Controles*

Las muestras de los sujetos control se utilizaron tanto en las pruebas bioquímicas como en las técnicas moleculares para obtener valores de referencia y como garantía de calidad de dichos métodos. Estos sujetos fueron elegidos en función de los pacientes estando siempre pareados en edad y sexo con los mismos.

1.2. *Pacientes*

Los pacientes fueron incluidos en los diversos estudios de este trabajo cuando la historia clínica, las pruebas bioquímicas funcionales (CK, prueba de ejercicio en isquemia) y/o las determinaciones histológicas e histoquímicas fueran indicativas de la enfermedad de McArdle, y siempre en función de la muestra biológica de partida, pudiendo ser esta sangre total periférica y/o músculo esquelético.

Bajo estos criterios todos los pacientes incluidos en esta tesis presentaron los síntomas y signos clínicos característicos de la enfermedad, describiendo una intolerancia al ejercicio desde la niñez con presencia de mialgias y calambres, y elevados niveles basales de CK en suero (350-500 U/L) que aumentaron durante los periodos de crisis (2.300- 15000 U/L, Normal < 170 U/L). Todos los pacientes sufrieron, al menos, un episodio de mioglobinuria. En todos aquellos en los que se realizó la prueba de ejercicio en isquemia en el antebrazo (PAEI), ésta mostró la ausencia de elevación de los niveles de lactato sérico esperados (“curva plana”).

Además se utilizó el ADN genómico obtenido a partir de sangre procedente de 200 individuos controles sanos y el ADNc obtenido a partir de ARN de músculo de 30 controles sanos con objeto de descartar la presencia de las nuevas mutaciones en la población.

2. MUESTRAS DE TRABAJO

Se subdividieron en dos tipos: muestra primaria y muestra de trabajo.

2.1. Muestra primaria

2.1.1. Sangre total

Se extrajeron 15 mL de sangre depositándose en un tubo con EDTA como anticoagulante. Se procedió a su procesamiento inmediato para la obtención de ADN o ARN total.

2.1.2. Músculo esquelético

Dicho tejido se obtuvo realizando una biopsia muscular abierta de los músculos vasto externo ó bíceps. Todas las biopsias de músculo esquelético se congelaron inmediatamente tras su extracción en nitrógeno líquido y posteriormente se conservaron hasta su análisis en un congelador a -80°C .

2.2. Muestra de trabajo

2.2.1. ADN Genómico (ADNg)

a) Sangre total

Para obtener ADN directamente de sangre se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante del sistema de extracción nucleon BACC3 (GE Healthcare), cuyo fundamento es la precipitación de proteínas con perclorato sódico y su separación del ADN mediante cloroformo y una resina patentada. La solución de ADN puede conservarse a -20°C .

b) Músculo esquelético

Para el aislamiento de ADN a partir de músculo esquelético se ha seguido el método descrito por Sambrook y colaboradores (229), con algunas modificaciones. Se parte de una cantidad superior a 50 mg de tejido muscular congelado a -80°C y se tritura en un mortero evitando su descongelación con ayuda de nitrógeno líquido. Se deposita todo el tejido en tubo de polipropileno de 2 mL, al que se añaden 180 μL de tampón TSE (Tris-HCl 100 mM pH=7,4, NaCl 10 mM, EDTA 25 mM) y 20 μL de solución acuosa de proteinasa K (20 mg/mL). Se mezcla y se incuba 5 minutos a 55°C . Se añaden otros 180 μL de tampón TSE, 20 μL de proteinasa K y 40 μL de Dodecil Sulfato de Sódico (SDS). Se mezcla y se incuba 60 minutos a 55°C . Se añaden 20 μL de proteinasa K y se incuba a 55°C durante 30 minutos. Se incorporan 50 μL de NaCl 5M y 1 mL de “mezcla de aislamiento” (fenol saturado equilibrado con Tris-HCl 1M pH=8 con 0,1% de isoquinolina incorporada, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción

100:96:4), comprobando previamente que su pH es superior a 8. Se agita y se centrifuga a 14.000xg brevemente para separar las fases. Se recoge el sobrenadante y se lava dos veces con 1 mL de éter dietílico. Una vez evaporado el éter, se añaden 1,5 mL de etanol al 98%, lo que provoca el precipitado de las hebras de ADN, que se recogen en un tubo de polipropileno de 1,5 mL estéril. Se elimina el resto de etanol en un evaporador de vacío y el ADN se disuelve en 50-100 μ L de Tris-EDTA (TE) 1X estéril (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH=7,4). La solución de ADN puede conservarse a - 20 °C.

2.2.2. ARN Total

a) Sangre total periférica

El protocolo que se usó para la extracción de ARN está basado en el método clásico ideado por Chomczynski y Sacchi (62) . El material usado en la extracción de ARN fue tratado para evitar la acción de las ARNasas presentes en el ambiente. El material de vidrio fue sometido al menos 2 horas a 200°C y se usaron puntas de pipeta con filtro. El aislamiento de la fracción de células mononucleadas (PBMC) para la extracción se realizó depositando suavemente 15 mL de sangre con pipeta Pasteur sobre 10 mL de Ficoll (GE Healthcare), procurando mezclar la fase celular y la fase plasmática cuando se hubiera producido sedimentación. A continuación se centrifuga el tubo a 2000xg durante 20 minutos a 20°C. Cuidadosamente se recogió el anillo intermedio que contiene la PBMC depositándose en un nuevo tubo. Se añadió PBS 1X hasta alcanzar un volumen final de 50 mL y se centrifugó a 2500 xg durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de Tripure Isolation Reagent (Roche), resuspendiendo el sedimento mediante pipeteo hasta conseguir disgregar el lisado celular. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para asegurar la completa disociación de los complejos nucleo-proteicos. El producto se traspasó a un tubo de 2 mL, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 13000xg a 4°C durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante (incoloro) y se añadieron 500 μ L de isopropanol y se incubó, nuevamente, a temperatura ambiente durante 10 minutos, con una centrifugación posterior a 13000xg, a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante final fue eliminado por decantación. El sedimento se lavó con etanol al 75% hasta un volumen final de 2 mL, se centrifugó a 10500 xg durante 5 minutos a 4°C y se decanto. El sedimento, ARN, se resuspendió en un volumen final de 40 μ L de agua libre de ARNasas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

b) Músculo esquelético

El ARN total fue extraído de músculo esquelético usando el kit comercial ToTALLY ARNTM (Ambion, Austin, TX) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Este ARN fue tratado con la deoxiribonucleasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA) con el fin de eliminar cualquier traza de ADN. El ARN fue almacenado a -80°C hasta su uso.

c) Monocitos

Las PBMCs (10^7 células, aproximadamente) se incubaron 15 minutos a 4°C con 20 μL de microesferas magnéticas recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-CD14 y se separaron mediante selección positiva utilizando un separador de células autoMACS (Miltenyi Biotec) (230). Los monocitos unidos a las microesferas magnéticas a través del anticuerpo anti-CD14 son retenidos en la columna mientras se aplica un campo magnético y el resto de células salen al exterior (figura 32). Finalmente, las células retenidas fueron específicamente eluidas como fracción positiva, al suspender el campo magnético, utilizando tampones que no contenían albúmina (PBS, pH 7.2) y, posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo. Para ello se incubaron $1,5 \times 10^5$ monocitos en PBS 1X durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, utilizando para el marcaje positivo anticuerpos frente a CD14, PE Mouse Anti-Human CD14 (BD Pharmingen) y, como control de fondo IgG1 (Becton Dickinson). Una vez lavadas las células con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo FacScan (Becton Dickinson) usando el programa CellQuest (Becton Dickinson).

El ARN fue obtenido de ambas fracciones, CD14+ y CD14-, por separado usando el kit Tripure Isolation Reagent (Roche), como se ha descrito en el apartado 2.2.2. a).

d) Fibroblastos

Para el aislamiento de ARN total a partir de células en cultivo se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

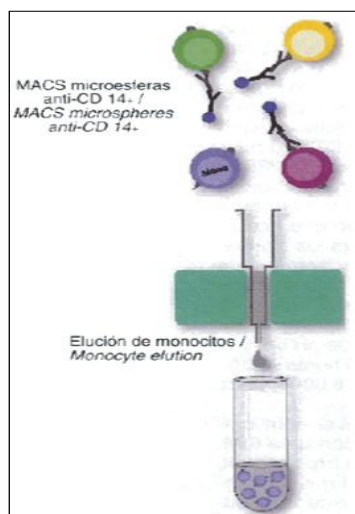


FIGURA 32. Aislamiento de monocitos mediante el sistema “Magnetic cell sorting particles” (MACS) (Magnetic Cell Sorting and Separation of Biomolecules; Miltenyi Biotec). (Figura modificada a partir del Monocyte isolation KIT).

3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MIOFOSFORILASA

3.1. Fundamento

La actividad de la miofosforilasa en tejido muscular se determinó siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Di Mauro y colaboradores (231) con pequeñas variaciones.

Es un método enzimático continuo que mide el incremento de absorbancia a 340 nm causado por el NADPH generado a través de un sistema de reacciones acopladas que comienzan cuando existe actividad glucógeno fosforilasa muscular (figura 33). El sistema analítico lleva incorporado 5'-AMP como activador de la fosforilasa b.

3.2. Descripción

Alrededor de 30 mg de tejido muscular congelado son homogeneizados manualmente en un potter de vidrio émbolo esmerilado colocado en hielo con 9 volúmenes de "tampón MPL" (β -glicerolfosfato 40 mM, NaF 40 mM, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 20 mM, pH=6,8). El homogenado crudo se centrifuga a 10.000xg a 4 °C durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante.

La actividad enzimática se detecta espectrofotométricamente. El medio en el que se detecta la actividad contiene en un volumen final de 1 mL: tampón fosfato sódico 20 mM pH=7,2, $MgCl_2$ 2 mM, $NADP^+$ 1mM, glucógeno tipo II de ostra 0,1 % (p/v), 1 U de fosfoglucomutasa de músculo de conejo, 1 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de levadura del pan (figura 33). Se añaden 10 μ L de sobrenadante para determinar la actividad residual de la enzima, durante 2 minutos a 30 °C, al final de los cuales se añade el activador, 5'-AMP 0.8 mM, continuando la medida durante 5 minutos más. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado en un espectrofotómetro UV-Vis DU-650 (Beckman Instruments).

La actividad enzimática de la GPM (A) se expresó en μ moles de glucosa-1-P liberada por minuto y por gramo de tejido. Debido a que por cada mol de glucosa-1-P que se produce se obtiene un mol de NADPH, se puede determinar el incremento de absorbancia a 340 nm por minuto, y este dato se multiplica por un factor (F).

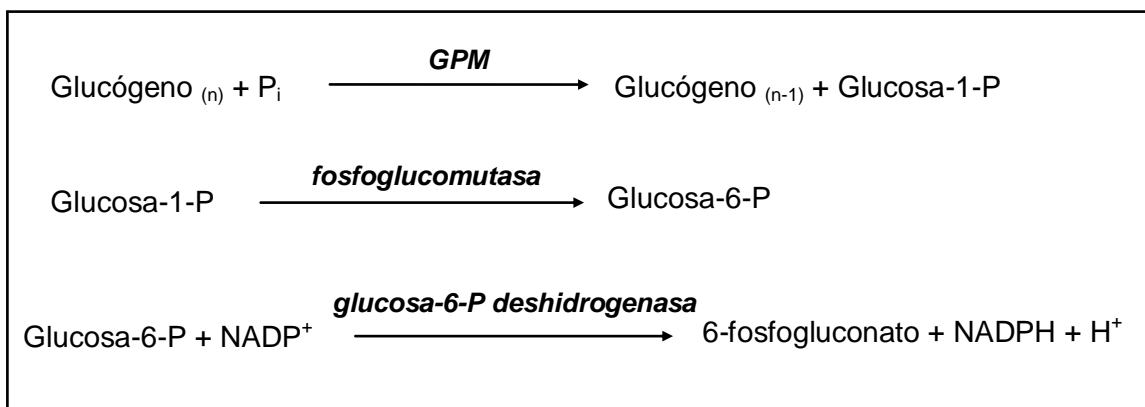


FIGURA 33. Método de determinación de miofosforilasa.

$$A (\mu\text{mol min.}^{-1} \text{ g}^{-1}) = (\text{Incremento de absorbancia} \times \text{min.}^{-1}) \times F$$

$$F = \frac{1.000 (\mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}) \times 10 \text{ mL/g tejido}}{\mu\text{L tejido} \times \text{Coef. Extinción} (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})} = 161,3$$

4. CRIBADO MUTACIONAL DEL GEN PYGM

Dado que el 76% de los pacientes con la enfermedad de McArdle presentan al menos una de las tres mutaciones más prevalentes en la población española (33), el cribado de éstas es el primer paso a realizar para la caracterización genética de los mismos. La detección de las tres mutaciones se realizó mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, y la posterior digestión de los fragmentos amplificados con la endonucleasa de restricción correspondiente (RFLP). La separación de los fragmentos de restricción se ha realizado con electroforesis en gel de agarosa a concentraciones que permitieran la diferenciación de los mismos. Como sistema de detección se ha utilizado bromuro de etidio 0.01% visualizando la fluorescencia producida en un transiluminador ultravioleta (Bio Rad).

4.1. Mutación p.R50X

Esta mutación sin sentido es producida por la transición C → T en el nucleótido 148 en el codon 50 en el exón 1 del gen *PYGM*, lo que crea un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción *Nla* III que reconoce la secuencia 5'-CATG↓-3'.

Para su análisis, se amplificó un fragmento del gen *PYGM*, que contenía la posición nucleotídica diana, con un tamaño de 418 pb. Mediante PCR se amplificaron 100 ng de ADN genómico en 35 ciclos constituidos por desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 64 °C durante 15 segundos y extensión a 72 °C

durante 1 minuto. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95° C durante 4 minutos y una extensión final durante 10 minutos a 72 °C. Cada 50 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa (Cultek Inc), 20 pmoles de cada cebador (cebadores 1F y 1R, tabla IV) 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. Tras la amplificación, 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *Nla* III en presencia de 100 µg/mL de BSA en un volumen final de 40 µL durante 2 horas a 37 °C. Los fragmentos generados se detectaron en una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución (Roche Diagnostics) al 2,5%.

Para analizar los resultados se tuvo en cuenta que la enzima *Nla* III posee un sitio de restricción en la secuencia normal de este fragmento del gen *PYGM* (figura 34).

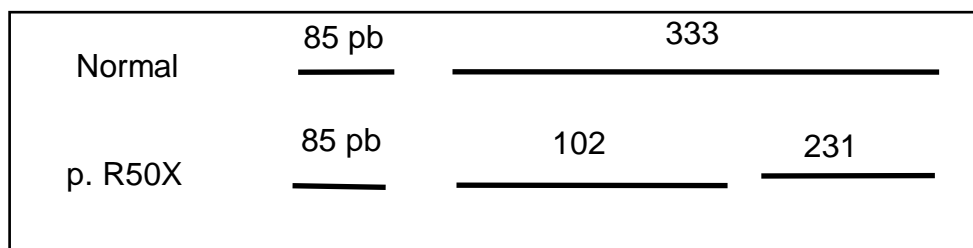


FIGURA 34. Fragmentos de restricción obtenidos con *Nla* III en el análisis de la mutación p.R50X del gen *PYGM*.

4.2. Mutación p.W798R

Esta mutación es causada por la transición T → C del nucleótido 2393 en el codon 798 del exón 20 del gen *PYGM*, lo que crea un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción Bsr- BI que reconoce la secuencia 5'-GAG↓CGG-3'.

Para su análisis se amplificó un fragmento de 909 pb del gen *PYGM*, que contenía la posición nucleotídica diana. Mediante PCR se amplificaron 100 ng de ADN genómico con 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 58°C durante 15 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos y una extensión final durante 10 minutos a 72 °C. Cada 50 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa, 20 pmoles de cada cebador (cebadores 18F y 20R, tabla IV), 200 µM de cada dNTP, y 1 mM MgCl₂ en el tampón suministrado. Tras la amplificación, 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *Bsr- BI* en un volumen final de 40 µL durante 2 horas a 37 °C. La detección de los fragmentos se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2 % (figura 35).

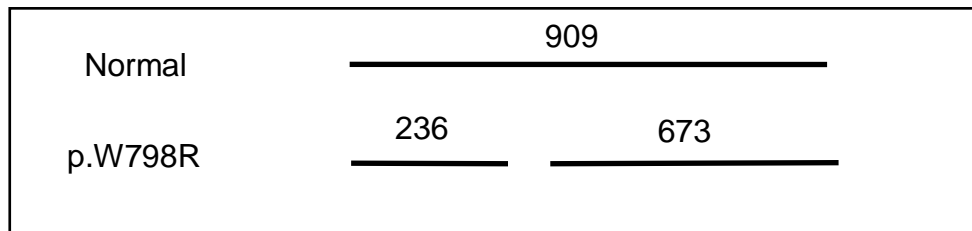


FIGURA 35. Fragmentos de restricción obtenidos con *Bsr-BI* en el análisis de la mutación p.W798R del gen *PYGM*.

4.3. Mutación p.G205S

Esta mutación es causada por la transición G → A del nucleótido 613 en el codon 205 del exón 5 del gen *PYGM*, lo que elimina un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción *Cfr I* que reconoce la secuencia 5'-Y↓GGCCR-3'.

Para su análisis se amplificó un fragmento de 409 pb del gen *PYGM*, que contenía la posición nucleotídica diana. Mediante PCR se amplificaron 100 ng de ADN genómico con 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 61°C durante 15 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos y una extensión final durante 10 minutos a 72 °C. Cada 50 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa, 20 pmoles de cada cebador (cebadores 5F y 5R, tabla IV) 200 µM de cada dNTP, DMSO 3% y 1,5 mM MgCl₂ en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *Cfr I* en un volumen final de 40 µL durante 2 horas a 37 °C. La detección de los fragmentos se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2 % (figura 36).

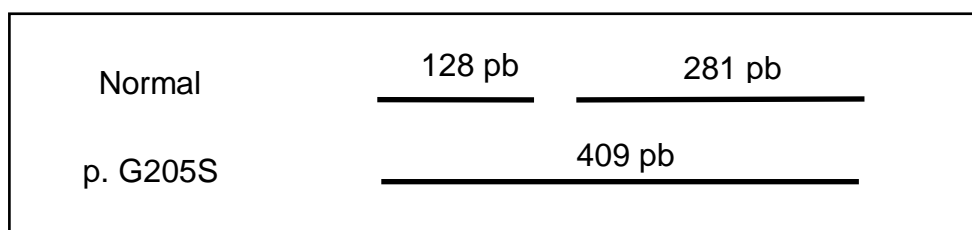


FIGURA 36. Fragmentos de restricción obtenidos con *Cfr I* en el análisis de la mutación p.G205S del gen *PYGM*.

4.4. Estudio de nuevas mutaciones

Con el propósito de confirmar en los pacientes las nuevas mutaciones identificadas en este trabajo, descartando su presencia en los sujetos control, se desarrollaron métodos del PCR-RFLP para algunas de estas mutaciones. En la tabla IV se muestran los cebadores y enzimas de restricción empleados.

MUTACIÓN	ENZIMA (*)	Tª	TIEMPO	OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO PCR	PATRÓN BANDAS NATURAL (pb)	PATRÓN BANDAS MUTANTE HO (pb)
p. Q176_M177insVQ	<i>Bsu 36I</i>	37°C	2 horas	5F:aaagccagctggtgccctgaaa 5R:ctggctctgttctctct	399pb	399	209 190
p.M442K	<i>Nla III</i>	37°C	2 horas	11F:ttcctgggtctggttctagc 11R:gggcttctgtgtgacagagg	325pb	137 78 71 39	137 117 71
p.R771PfsX33	<i>BshTI</i>	37°C	2 horas	18F:gacctgggtttgacctgg 20R:agagatctaactccagtacc	909pb	669 240	909
p.G136AfsX159	<i>Mwo I</i>	60°C	2 horas	3F:tgtgtgtgggtggggcaaa 4R:cggacctttccagagatgataaa	438pb	222 145 71	367 71

TABLA IV. Estudio de las nuevas mutaciones mediante PCR-RFLP. (*) Endonucleasas de Restricción (New England Biolabs, Beverly, Mass. www.neb.com). HO: homocigosis.

5. SECUENCIACION DIRECTA DEL GEN PYGM

En los pacientes en los que no se logró identificar el genotipo completo mediante el cribado de las tres mutaciones más prevalentes en el gen *PYGM*, descrito anteriormente, se estudió la secuencia directa de las zonas codificantes y de las regiones adyacentes de las uniones exón-intrón mediante el método descrito por Kubisch y cols. (23), con pequeñas modificaciones.

La metodología aplicada consistió en la amplificación por PCR de los 20 exones y de las regiones circundantes de uniones exón-intrón del gen *PYGM* gracias a la utilización de oligonucleótidos localizados en zonas intrónicas que flanquean a los exones (etapa de amplificación). Una vez amplificados los distintos fragmentos, éstos fueron purificados (etapa de purificación) y después sometidos a una PCR de secuenciación cíclica ("Cycle sequencing") utilizando didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos (etapa de secuenciación). Tras la purificación de los productos de secuenciación, los distintos fragmentos producidos en la reacción de secuenciación se separaron y detectaron mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) (etapa de análisis).

5.1. Etapa de amplificación

Los oligonucleótidos cebadores utilizados en la amplificación de los exones del gen *PYGM* se muestran en la tabla V. Para realizar la PCR, se utilizaron alrededor de 100 ng de ADN que fueron amplificados en 35 ciclos formados por una desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, una hibridación durante 15 segundos, Kubisch y cols. (129), y una extensión a 72 °C durante 1 minuto. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos y una extensión final a 72 °C durante

10 minutos. Cada 50 µL de reacción contenía 1 U de *Taq* polimerasa (Cultek Inc.), 200 µM de cada dNTP, 20 pmoles de cada cebador y 1,5 mM de MgCl₂ en el tampón suministrado.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5' -3'</i>	<i>Producto de PCR (pb)</i>	<i>Hibridación (°C)</i>
1F 1R	agctccactccttggt tagagtgcagagggcagccactt	418	64
2F 2R	tgggcctggctgagtgttg ttctccagctcctccatgt	285	64
3F 4R	tgtgtgtgggtggggcaa cggacctttccagagatgataaa	424	66
5F 5R	aaagccagctggtgccctgaaa ctggtcctgcttctctct	371	61
6F 7R	atcgatgctagacaaggacaa atgcacaaggccagcaata	537	55
8F 8R	accacgcagctttagccatgc agaggcctagcacacactgtccggtcac	262	70
9F 9R	acagcccagtcacagaaccgtgc ttcatatctctccacgctccaaa	328	64
10F 10R	gggatgcgtagtgtgagg cgactcccaggcccagactgg	284	67
11F 11R	ttcctgggtctggttctagc gggcttctgtgtgacagagg	276	64
12F 12R	cccttcagcaagacaccagg gtgaaccacctacacgaccatacc	289	61
13F 13R	gcttggtgacctggaaatgg cacgcctgaccagacatctgg	264	67
14F 14R	actggagtgtggactgtagg aagtcaaaggagatgttgg	312	64
15F 16R	ctctgtcaggagctactacc aagtatcccaggaagagacg	482	61
17F 17R	ccagcctaacttgagagtcc tggaccagtcttccagacg	380	64
18F 20R	gacctgggtttgacctgg agagatctaactccagtacc	909	58

TABLA V. Cebadores utilizados para la amplificación del gen *PYGM*. Los nombres de los cebadores se corresponden con los exones amplificados (XF = cebador directo, y XR = cebador reverso). pb: pares de bases. El cebador directo y el cebador reverso para una amplificación por PCR se encuentran en un recuadro. Las secuencias están obtenidas a partir de las secuencias depositadas en el GenBank con números de acceso U94774-U94777. Los cebadores 18R y 19F, sólo son utilizados para la secuenciación del amplicón 18F-20R.

5.1.1. PCR Larga (“Long Range” PCR)

Se realizó una PCR larga con el kit de Takara Biomedics, utilizándose 100 ng de ADN genómico que fueron amplificados en 30 ciclos formados por una desnaturalización a 98°C durante 30 segundos y una hibridación durante 15 minutos. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Cada 50 µL de reacción contenían 0.5 U de *Taq* LA polimerasa (Takara Biomedics), 8 µL de dNTPs propios del kit, 20 pmoles de cada cebador (tabla V) y 5 µL del tampón Long PCR 10X. Los productos obtenidos fueron purificados en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve Low Melting Agarose, FMC Products), y el fragmento de interés se purificó con el sistema “GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó con una serie de cebadores internos (tabla VI).

	<i>Oligonucleótido 5'→3'</i>	
<i>PCR</i>	e15 F	CTCTGTCAGGAGCTACTACC -
	e18 R	GCTTCCCCACACACACCTGA -
<i>Cebadores Internos</i>	e15 F	CTCTGTCAGGAGCTACTACC
	i16 1F	TCTGACTAGTTCAGTCTCAAGG
	i16 2F	CCAAGTAGCTGGGATTATAGG
	i16 3F	GCTGGTGAAGACTGGGAGTT
	e17 F	CCAGCCTAATCTGAGAGTCC
	i17 3R	CCTCCTGGATTACACCATT
	i17 4F	TCACACCTGTAATCCCAGCA
	i17 5F	ACGGAGTCTCGCTCTGTCAC
	i17 6F	TGGCCAGGATGGTCTCTATC
	i17 7F	TCCATGTGGCTGGACACTAA
	i17 8F	GAAGGGTTATCTTTTTTTTTTTTTTG
	e18 F	GACCTGGGTTTTGACCCTGG
	e18 R	GCTTCCCCACACACACCTGA

TABLA VI. Cebadores utilizados para el mapeo de la delección del exón 17: c.(1969+214)_(2177+369)]del, mediante PCR Larga. F: forward; R: reverse; i: intrón; e: exón

5.2. Etapa de purificación

Los productos de PCR obtenidos en la etapa de amplificación se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de interés se purificó con el sistema “GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado se determinó espectrofotométricamente la concentración de ADN.

5.3. Etapa de secuenciación

Aproximadamente 50 ng de cada producto de PCR fue secuenciado directamente con 5 pmoles de cada cebador utilizado en la etapa de amplificación (tablas IV y V) con ABIDyeDeoxy Terminador Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) siguiendo el protocolo del fabricante. El termociclador se programó, en todos los casos, con una desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos seguida de 25 ciclos compuestos por una desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, una hibridación a 55 °C durante 15 segundos y una extensión a 60 °C durante 4 minutos.

Tras la reacción de secuenciación se precipitó el producto con una mezcla compuesta por 50 µL de alcohol etílico 100%, 2 µL de acetato sódico 3M y 2 µL de EDTA 125 mM, dejando la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se centrifugó a 14000xg durante 20 minutos a 4 °C. Después de eliminar la solución alcohólica, se lavaron con 200 µL de etanol al 70% preenfriado, centrifugándose después durante 7 minutos a 14000xg a 4 °C. Se evaporó el etanol en el termobloque a 37 °C y el residuo seco se guardó a -20 °C hasta su análisis en el secuenciador automático. El residuo fue reconstituido con 25 µL de HiDiFormamida (Applied Biosystems), y se dejó rehidratando a temperatura ambiente durante 30 minutos. El secuenciador ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied BioSystems) se programó siguiendo las instrucciones del fabricante. En síntesis su funcionamiento se basa en la separación de los fragmentos mediante una electroforesis capilar, excitación con luz láser de los fluorocromos y análisis de los datos con un programa informático que muestra los resultados en un “electroferograma” cuyos picos representan la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de ADN procesada.

5.4. Etapa de análisis

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias revisadas del gen *PYGM* depositadas en GenBank. La presencia de dos nucleótidos en la misma posición (heterocigosis para una mutación puntual) se puso de manifiesto por la superposición de dos picos en el electroferograma, hecho que fue comprobado en ambas direcciones de secuenciación. La presencia de microdeleciones o microinserciones en un solo alelo provoca la aparición en el electroferograma de picos

desfasados de un alelo respecto a otro, produciéndose un solapamiento de los mismos.

6. ANALISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL GEN PYGM

El estudio transcriptómico del gen se realizó mediante la extracción del ARN total de músculo, fibroblastos y/o sangre total, copia a ADNc por retrotranscripción (RT-PCR) y posterior amplificación del ADNc correspondiente a la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa y su secuenciación. La concentración y calidad del ARN obtenido fue verificado mediante el uso de NanoChips en el Bioanalyzer 2100 y analizado con el Software correspondiente en su versión B. 02.02 (Agilent, Santa Clara, CA).

6.1. ADNc Total

El ADNc de sangre total y de músculo fue sintetizado usando el kit de Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com), High-Capacity ADNc Archive kit, siguiendo las instrucciones del mismo.

También se obtuvo mediante esta metodología una copia de ADNc procedente de ARN total de un cultivo primario de fibroblastos.

6.2. Cuantificación del ARNm

Los niveles del ARNm del gen *PYGM* fueron cuantificados mediante PCR cuantitativa a Tiempo Real. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, la mayoría se basan en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a la secuencia de ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando, emitiendo una intensidad de luz detectada por el termociclador. En este trabajo se utilizó el sistema 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Se emplearon tres tipos de sondas TaqMan para el estudio de los transcritos del gen *PYGM*: una contra un fragmento localizado entre los exones 6 y 7 (Hs00194493, Applied Biosystems) que se usó en todas las muestras; otra entre los exones 1 y 2 (Hs00989945, Applied Biosystems) y otra entre el exón 17 y el exón18 (Hs00989942, Applied Biosystems). Estas sondas se usaron alternativamente en diferentes pacientes con el fin de descartar variaciones en la cuantificación debidas a la localización de la

sonda. Además, se utilizó una cuarta sonda contra un gen constitutivo, la Ciclofilina A (*PPIA*), para la normalización de los resultados.

La PCR a tiempo real se realizó siguiendo el protocolo detallado en el kit. La reacción se realizó a volumen final de 20 μ L incluyendo 5 μ L de ADNc como molde. Se llevo a cabo un ciclo a 50°C durante 2 minutos y luego, a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos formados por 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Todas las muestras se realizaron por triplicado (21).

6.3. Amplificación del ADNc

Tras la obtención del ARN total el ADNc del gen *PYGM* fue amplificado en 2 fragmentos solapados, para el ARN obtenido a partir de músculo y en 6 fragmentos solapados para el ARN obtenido a partir de la PBMC y de fibroblastos; los oligonucleótidos empleados aparecen en la tabla VI. Adicionalmente, se amplificó como control de ADNc, un fragmento de 1200 pb correspondiente al gen constitutivo *PBGD* (porfobilinógeno desaminasa) y que se expresa de forma constitutiva. Las condiciones de las reacciones de PCR fueron 35 ciclos formados por una etapa de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, una etapa de hibridación a la T_m correspondiente a cada pareja de cebadores (tabla VII) durante 30 segundos y una etapa final de extensión a 72°C de 1 minuto y 30 segundos. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los fragmentos amplificados correspondientes se visualizaron en un geles de agarosa al 1 y al 1.5%. Posteriormente, se purificaron mediante columnas, como se ha descrito en el apartado 5.2. de este trabajo.

6.4. Secuenciación del ADNc

Tras la purificación de los dos fragmentos de ADNc del gen *PYGM*, estos se secuenciaron utilizando una serie de cebadores exónicos (tabla VIII) con el kit ABIDyeDeoxy Terminador Cycle sequencing, respetando las condiciones de la reacción de secuenciación y la de precipitación del apartado 5.3. Los precipitados rehidratados fueron analizados en un secuenciador ABI-PRISM 3130xl Genetic Analyzer (PE-Applied BioSystems). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las correspondientes al ADNc del gen *PYGM*.

Cebador	Secuencia 5' -3'	Producto de PCR (pb)	Hibridación (°C)
MÚSCULO ESQUELÉTICO			
A ADNc PYGM 1F	tccactccttggtggag	1489	59
A ADNc PYGM 1R	cctcaagaagaccatcttcaaa		
B ADNc PYGM 2F	gacaaggcgtgggatgtg	1520	61
B ADNc PYGM 2R	cagcacctcatgcagagg		
SANGRE Y FIBROBLASTOS			
ADNc PYGM SG1F	tccactccttggtggag	621	56
ADNc PYGM SG4-5R	tcgcggtcctccatctg		
ADNc PYGM SG3-4F	cagcctgctttctgactcc	586	58
ADNc PYGM SG8-9R	gatgggccaccttatctggaa		
ADNc PYGM SG7-8F	acttcaatgtcgggtgctaca	640	50
ADNc PYGM SG11-12R	tttgaagatggtcttcttgagg		
ADNc PYGM SG9-10F	gacaaggcgtgggatgtg	745	58
ADNc PYGM SG14-15R	cagccttcctccaatcat		
ADNc PYGM SG13-14F	ccaaagtgaagcaggaaaaca	580	58
ADNc PYGM SG17-18R	gcattgtaccctctttggtca		
ADNc PYGM SG16-17F	tcactggccgagaaagtgat	653	58
ADNc PYGM SG20utrR	cctctgcatgaggtgctg		
GEN CONTROL			
PBGD C1F	agtgtggtggcaacattgaa	1200	60
PBGD C1R	gagaagtccaagcaacagcc		

TABLA VII. Cebadores utilizados para la amplificación del ADNc del gen PYGM.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5' -3'</i>
cPYGM1F	tccactccttgctggag
cPYGM3-4F	cagcctgctttcttgactcc
cPYGM4-5R	tcgcggtcctccatctg
cPYGM7-8F	acttcaatgtcgggtgctaca
cPYGM9-10F	gacaaggcgtgggatgtg
cPYGM11-12R	tttgaagatggtcttcttgagg
cPYGM13-14F	ccaaagtgaagcaggaaaaca
cPYGM14-15R	cagccttcctccaatcat
cPYGM16-17F	tcactggccgagaaagtgat
cPYGM17-18R	gcattgtaccctcttggtca
cPYGM20R	cctctgcatgaggtgctg

TABLA VIII. Cebadores internos utilizados para la secuenciación del ADNc del gen PYGM.

7. CLONAJE

La clonación se realizó utilizando el kit comercial pGEM-T Easy Vector Systems II de Promega (figura 37). Tras la transformación en células ultracompetentes, JM109, los insertos fueron amplificados directamente de cada colonia, purificados con el sistema Wizard Plus SV Minipreps (Promega), y secuenciados en ambas direcciones.

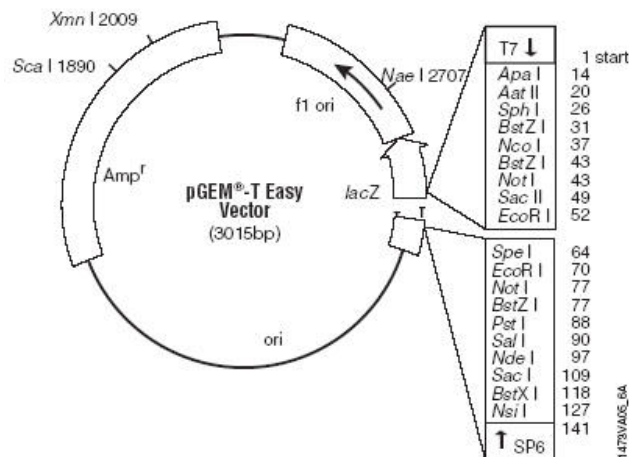


FIGURA 37. Esquema del vector pGEM- T Easy (promega).

7.1. Etapa de ligación

En un eppendorf de 0.5 mL, en hielo, se añaden las cantidades indicadas por el fabricante (tabla IX) y se agita con cuidado. Esta reacción de ligación tendrá lugar durante las 16 horas posteriores a una temperatura de 4 °C.

2x Rapid ligation Buffer, T4 ADN ligase	5 µL	
pGEM- T (50 ng)	1 µL	
PCR product	ADNc: 2 µL	PCR 50 ng/mL: 1 µL
Agua estéril	1 µL	2 µL
T4 ADN Ligase (3 units/µL)	1 µL	

TABLA IX. Mezcla para la reacción de ligación indicada en el kit pGEM-T Easy Vector Systems de Promega.

7.2. Etapa de transformación

Se añadieron 2 µL de cada tubo a un tubo estéril de 1.5 mL (siempre en hielo). Se colocaron las células (-80°C) competentes (JM109, Promega) en hielo 5 minutos y se

mezclaron, agitando el tubo. Fueron transferidos 50 μL en los tubos de 1.5 mL y agitados suavemente. Se incubaron en hielo durante 20 minutos. Se realizó un choque térmico de 45 segundos con una incubación a 42 $^{\circ}\text{C}$ exactamente, sin agitación. Esta es la etapa clave de la transformación. Tras esto, se introdujo la mezcla durante 2 minutos en hielo. Seguidamente se añadieron 950 μL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, Mg^{2+} 20 mM y glucosa 20 mM). La entrada del ADN en la célula se ve facilitada por la presencia de cationes divalentes (Mg^{2+} ó Ca^{2+}). Se incubó durante 1.5 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ en agitación (150 rpm). Tras esto, fueron sembrados 100 y 200 μL de cada cultivo transformado en las placas de LB-Agar- Ampicilina que fueron preparadas previamente conteniendo IPTG (50mg/mL) y X- GAL (50mg/mL). Finalmente, las placas se incubaron toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$.

7.3. Etapa de Selección

La selección fue visual, las colonias que tenían actividad β -Galactosidasa fueron aquellas que no tenían insertado nuestro fragmento de interés, por lo tanto eran de color azul y crecían de forma más lenta. Por el contrario, aquellas que si portaban nuestro amplicón lo tenían insertado en el gen β -GAL del pGEM-T, y por esto, no podían metabolizar el sustrato dispuesto en el medio, correspondiendo a las colonias de color Blanco. Las seleccionadas fueron sembradas en 5 mL de LB- Ampicilina, cada una e incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$, 225 rpm durante toda la noche.

7.4. Etapa de Purificación

La purificación de los cultivos de las colonias seleccionadas se realizó con el sistema Wizard Plus SV Minipreps de Promega (figura 38). Se centrifugaron los 5 mL del cultivo, durante 5 minutos a 10000xg. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 250 μL Wizard Plus SV Resuspension Solution. Se agitó en vortex hasta resuspender. Se añadió 250 μL WP Lysis Solution y se mezcló por inversión 4 veces, se dejó temperatura ambiente de 1-5 minutos hasta que la suspensión fuese clara. Se añadieron 10 μL de proteasa alcalina, se mezclaron por inversión 4 veces y se incubó 5 minutos (como máximo, para evitar cortes en el plásmido) a temperatura ambiente. Tras esto, se añadieron 350 μL de WP SV Neutralization Solution y fueron mezclados por inversión. El lisado de bacterias fue centrifugado a 14000xg durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante en una microcolumna y luego, centrifugado durante 1 minuto a 14000xg a temperatura ambiente, luego el eluido fue desechado. Se añadieron 750 μL WP SV Wash Solution y se centrifugó 1 minuto a 14000xg. El eluido fue desechado y se añadieron 250 μL WP Wash Solution al sedimento. Se centrifugó 2 minutos a 14000 g y la columna fue transferida a un eppendorf estéril de 1.5 mL. Se añadieron 50 μL agua miliQ estéril y se centrifugó a 14000 g. El eluido fue recuperado, contiendo nuestro plásmido transformado purificado.

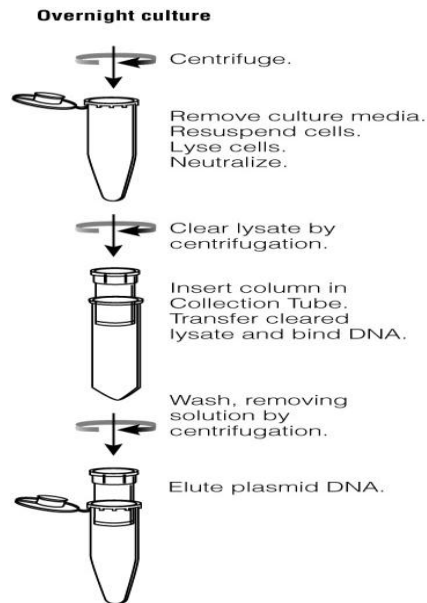


FIGURA 38. Esquema de la purificación de los plásmidos transformados mediante el método de las minipreps (Promega).

7.5. *Etapas de amplificación y secuenciación*

La amplificación y posterior secuenciación del inserto se realizó como se narra en el apartado 5.2 y 5.3, utilizando cebadores específicos para el vector pGEM-T, T7F y Sp6R (tabla X). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias revisadas del gen *PYGM* depositadas en GenBank.

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5' -3'</i>	<i>Hibridación (°C)</i>
T7F	taatacgactcactataggg	56
Sp6R	gatttggtgacactata	

TABLA X. Cebadores utilizados para la amplificación de los insertos del vector pGEMT.

8. *ANÁLISIS DE POLISOMAS DE MIOBLASTOS*

Los mioblastos fueron aislados de biopsias musculares mediante la técnica de cultivo de explantes (232). Los mioblastos se cultivaron en medio DMEM/M-199, 3:1, con suero fetal bovino al 10% (FBS), 10 mg/mL de insulina, 2 mM de glutamina, 25 ng/mL factor de crecimiento de fibroblastos y 10 ng/mL factor de crecimiento

epidérmico. Las células 100% confluentes fueron inducidas a diferenciarse de 7 a 12 días mediante la eliminación de los factores de crecimiento y la glutamina.

Los perfiles ribosomales fueron preparados a partir de un total de 2×10^7 mioblastos diferenciados miocitos-miotúbulos al 80% de confluencia, las cuales fueron lavadas con PBS 1X frío conteniendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de cicloheximida (Sigma) para bloquear el paso de elongación en la traducción. Las células fueron lisadas con el tampón A (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 80 mM KCl, 5 mM MgCl_2 y 100 mg/mL cicloheximida), al 1% (v / v) Tritón X-100, 40 unidades/mL ARNsin y una mezcla de inhibidores de proteasa conteniendo leupeptina, pepstatina, bestatina, aprotinina, cimostatina y antipaina (Sigma–Aldrich) a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, y PMSF 1 mM. La fracción citoplasmática se obtuvo tras la centrifugación a 15000xg durante 30 minutos a 4 ° C y se cargaron en un gradiente lineal del 10-50% de sacarosa (w / v) en el tampón A. Se centrifugó a 39.000 rpm (270000xg) en un rotor SW40 Ti (Beckman Coulter) durante 2h 15 minutos a 4°C. El análisis de polisomas se realizó en un equipo Absorbance/Fluorescence Monitor UA-5 y Density Gradient Fractionator 185 (Teledyne Isco) conectado a un PC con el programa informático *PicoLog for Windows*.

El ARN total fue aislado usando un kit de mini RNeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante, y el ARN recuperado se cuantificó midiendo la absorbancia a 260/280 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop™ ND-1000 (Tecnologías NanoDrop, Wilmington, DE, U.S.A.). Se obtuvo una copia del ADNc mediante retrotranscripción (RT-PCR) usando el kit SuperScript III First- Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) según el protocolo descrito en el mismo. La posterior amplificación y secuenciación del ADNc correspondiente a la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa se realizó según se describe en el apartado 6 de este trabajo. La calidad de la PCR obtenida fue medida mediante NanoChips usando el Bioanalyzer 2100 y analizada con el Software correspondiente en su versión B. 02.02 (Agilent, Santa Clara, CA).

9. ANÁLISIS POR INMUNOBLOTTING

9.1. Extracción de proteína total procedente de músculo esquelético, células en cultivo y sangre total.

9.1.1. Músculo esquelético

Las muestras que se utilizaron para las determinaciones de proteínas específicas mediante western blot, se obtuvieron de dos maneras: o bien del homogenado sobrante en la cuantificación bioquímica de la actividad enzimática de la miofosforilasa (apartado 3) o bien por homogenización de una fracción de músculo congelado. Aproximadamente, 30 mg de músculo se diluyeron 1/10 en el tampón de extracción (PBS 1X-SDS 1%) cuando aún estaba congelado para evitar la acción de las

proteasas, realizándose su manipulación en agua de hielo y evitando la formación de espuma, para evitar la retención de proteínas debido a la tensión superficial con el consecuente error en la posterior cuantificación. El músculo fue homogenizado manualmente en un potter de vidrio para volúmenes pequeños. El homogenado se centrifugó a 14000xg durante 1 minuto a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, y se procedió a la cuantificación de las proteínas totales mediante el método de Bradford (233).

9.1.2. Células en Cultivo: Mioblastos

Para la obtención de extractos de proteínas totales a partir de los cultivos primarios de mioblastos diferenciados a miocitos-miotúbulos (apartado 8), se utilizó el mismo tampón de homogenización, pero variando las condiciones de extracción. La monocapa fue lavada con PBS 1X frío tres veces, y en el último lavado se empleó tripsina 0.5% conteniendo EDTA al 0.02% para su recolección. Se centrifugaron a 14000xg durante 10 minutos a 4°C, y el sedimento obtenido fue resuspendido en 100 µL del tampón de extracción y trasvasado a un eppendorf de 1.5 mL donde se sonicó durante 30 segundos, en tres tandas de 10 segundos, manteniendo los tubos siempre en hielo. A continuación se centrifugaron a 14000xg durante 1 minuto a 4°C, recuperándose después el sobrenadante que se conservó en agua de hielo hasta la cuantificación de la proteína total mediante el método de Bradford.

9.1.3. Sangre total

Se procedió a la obtención de la fracción PBMCs a partir de 15 mL de sangre total periférica. Tras el lavado con PBS 1X y su posterior centrifugación (apartado 2.2.2), el sedimento obtenido fue resuspendido en 100 µL del tampón de extracción y transvasado a un eppendorf de 1.5 mL. Se sonicó con ultrasonidos durante 30 segundos, en 3 tandas de 10 segundos, manteniendo los tubos en hielo, igual que en el caso anterior. Tras esto se centrifugaron durante 1 minuto a 14000xg a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se procedió a la cuantificación proteica mediante el método de Bradford (234).

9.2. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (western blot)

50 µg de proteína de cada muestra se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5% utilizando métodos descritos previamente (229), que fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se preincubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (1X TBS, 0.1% Tween 20, 5% leche desnatada en polvo) y, a continuación se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en las condiciones preestablecidas para cada uno de ellos en solución de bloqueo (Tabla X). Las membranas se lavaron 3 veces con 1X TBS, 0.1% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora a temperatura

ambiente en solución de bloqueo usando la dilución correspondiente (Tabla XI). La membrana se lavó 2 veces con 1X TBS, 0.1% Tween 20, y otras 2 veces con 1X TBS. Como reactivo de revelado se utilizó el kit “Plus western blotting detection reagents” (GE). La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó por densitometrado con el programa informático ImageJ de libre utilización (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Anticuerpo	Origen	Proveedor	Dilución
Primario	Anti-GPM	Conejo	Abcam
	Anti- SERCA1	Ratón	Abcam
	Anti- GS	Conejo	Cell signaling
	Anti- α -Tubulina	Ratón	Sigma
Secundario	Anti-Mouse	Cabra	Novocastra
	Anti-Rabbit	Cabra	Abcam

TABLA XI. Anticuerpos empleados en la inmunodetección para el análisis por inmunoblot.

10. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional es una técnica analítica con una gran capacidad de separación, que permite analizar mezclas proteicas complejas de células, tejidos y fluidos biológicos. Esta técnica separa las proteínas de acuerdo con dos propiedades independientes en dos pasos separados.

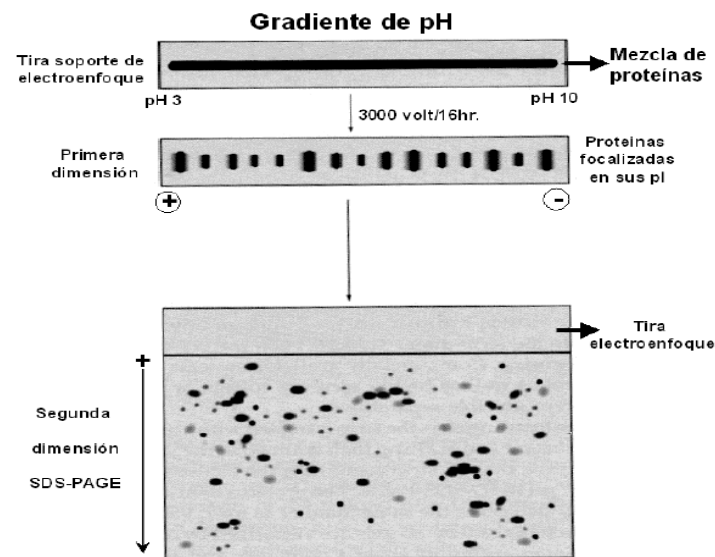


FIGURA 39. Esquema de la electroforesis bidimensional.

La electroforesis bidimensional se realiza en dos direcciones: el enfoque isoeléctrico (IEF) en la primera dimensión y la electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en la segunda dimensión. Por medio del IEF las

proteínas se separan según su punto isoeléctrico y con la SDS-PAGE se separan de acuerdo con su masa molecular. De esta forma, tras la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D- PAGE) tenemos un mapa proteico en el que las coordenadas de cada proteína corresponden a su punto isoeléctrico y su masa molecular (figura 39). Dependiendo del tamaño del gel y del gradiente de pH utilizado, la PAGE-2D puede resolver más de 5000 proteínas simultáneamente (\pm 2000 proteínas rutinariamente) y puede detectar <1 ng de proteína por mancha. Otra de las grandes ventajas de la PAGE-2D es que muestra las proteínas intactas, de forma que pueden detectarse las modificaciones posteriores o la traducción, que suelen aparecer como «trenes» de manchas diferenciados en el eje horizontal y/o vertical en el gel 2D. Además, la separación mediante PAGE-2D permite aislar las proteínas en cantidades del orden de miligramos para poder realizar estudios estructurales.

Se realizaron 2 replicas biológicas y 2 replicas técnicas de cada una de ellas, por lo que se analizaron 8 geles.

10.1. Rehidratación

La electroforesis bidimensional se realizó según el método descrito por O'Farrell (235), con algunas modificaciones. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un gradiente de pH inmovilizado (IPG) (236) con un rango de pH 3-11 no lineal (Immobiline DryStrip, 7cm; GE). Los geles fueron rehidratados durante 10 horas a temperatura ambiente en tampón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), ditioeritrol 65 mM, Pharmalyte pH 3-11 (GE) 2% (p/v) y trazas de azul de bromofenol).

10.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque

La primera dimensión (1D) se llevo a cabo con el sistema "EttanTM IPGphorTM Cup Loading Manifold", de GE, diseñado para realizar el isoelectroenfoque de proteínas con las tiras IPG de Amersham Biosciences de 3 mm de ancho y de 7 cm de largo en la unidad electroforética Ettan IPGphor. En este sistema, el isoelectroenfoque es realizado con el gel cara arriba, y la muestra es aplicada en una pequeña copa. Este método de carga de la muestra en copa es el que proporciona mejores resultados, en particular en rangos de pH básicos. Se cargaron 70 mg de proteína de cada extracto solubilizado en tampón de muestra (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), DTT 65 mM y Pharmalyte pH 3-11 (GE) 2% (p/v)). Las proteínas fueron previamente purificadas utilizando el kit de precipitación 2D-Clean up de GE, según instrucciones del fabricante y cuantificadas utilizando el método RC-DC de Bio Rad. La focalización de las proteínas se realizó siguiendo el siguiente programa: 1 hora a 300 V, 1 hora a 600 V, 1 hora a 900 V, 1 hora a 1200 V, 1200 V hasta alcanzar los 12000 V/hora y a 200 V durante 2 horas.

10.3. *Equilibrado*

Seguidamente se procedió a la reducción de las proteínas contenidas en las tiras con el tampón de equilibrado base (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, SDS 2%, Urea 6 M y glicerol al 30%) y DTT 65 mM durante 15 minutos y en agitación. Transcurrido este tiempo el tampón conteniendo DTT fue sustituido por otro con Iodoacetamida 250 mM, de esta manera los grupos anteriormente reducidos son alquilados.

10.4. *Segunda dimensión: 2D-PAGE-SDS*

La segunda dimensión se llevó a cabo rutinariamente en geles de 1 mm de espesor y al 10% de concentración de acrilamida/bisacrilamida, utilizando el sistema Mini Protean cell (Bio-Rad). Las tiras IPG se colocaron cuidadosamente en la parte superior de los minigeles en perfecto contacto con el gel y evitando la formación de burbujas. Para evitar cualquier desplazamiento, la tira IPG se selló con agarosa al 1% en tampón electrolito (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), a la cual se añadió una pequeña cantidad de azul de bromofenol para visualizar el frente de la electroforesis. En un extremo se colocó el patrón de pesos moleculares preteñido (Bio Rad, referencia 131-0324). La electroforesis se efectuó a 15 mA/gel durante los 15 primeros minutos y posteriormente a 30 mA/gel hasta el final.

Tras la electroforesis, los geles 2D fueron teñidos con Coomassie Blue G-250 (Sigma), según recomendaciones del fabricante, o bien transferidos a membranas de PVDF para su análisis por western blot (apartado 9.2). El software empleado para el análisis de la electroforesis bidimensional fue el ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE) que permite la cuantificación y comparación de los perfiles proteicos obtenidos, facilitando la identificación de proteínas que son expresadas de forma común así como de aquellas que son expresadas de forma diferencial.

11. *ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN CONDICIONES NATIVAS (BLUE NATIVE)*

La electroforesis bidimensional azul nativa (*blue native*) es una técnica que permite separar los diferentes complejos proteicos funcionalmente activos en su conformación nativa, en una primera dimensión (1D). Posteriormente, las diferentes proteínas que forman parte de los complejos, se separan en una segunda dimensión (2D), que se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes.

11.1. *Electroforesis en primera dimensión (1D)*

Para la primera dimensión se realizaron geles *blue native* con un gradiente del 3-12% de acrilamida/bisacrilamida (29:1), utilizando separadores de 1 mm. Se cargaron 50 µg de proteína de extracto citoplasmático enriquecido utilizando como ánodo el tampón A (50 mM Bis-Tris, pH 7.0) y como cátodo el tampón C1 (15 mM Bis-Tris/50 mM tricina a pH 7.0, conteniendo un 0.02% de Serva Blue G-250). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y a 80 V hasta que el frente de azul de coomassie se salió del gel. A la mitad de la electroforesis se cambió el tampón C1 por el tampón C2 (15 mM Bis-Tris/ 50 mM tricina, pH 7.0) para eliminar el exceso de azul de los geles. Las 1D se realizaron por triplicado; uno de los geles se utilizó para transferir las proteínas a una membrana de PVDF (apartado 9.2) y poder analizar los complejos en su conformación nativa, otro triplicado fue procesado para una segunda dimensión (2D) al 10% SDS-PAGE.

11.2. *Electroforesis en segunda dimensión (2D)*

Un gel *blue native* de 1D fue procesado para una 2D con el fin de separar las distintas proteínas de los complejos citoplasmáticos. Para ello, se recortó la banda de la 1D y se rotó 90° para ser utilizado como muestra de partida de la 2D. La banda fue incubada durante 1 hora con una solución desnaturalizante (1% SDS, 1% β-Mercaptoetanol). El exceso de solución desnaturalizante se eliminó utilizando papel de filtro. Este paso es esencial pues el β-Mercaptoetanol inhibe la polimerización de la acrilamida del gel concentrante de la 2D. Posteriormente, se montó el sistema de electroforesis, utilizando cristales con separadores de 0.75 mm. El gel separador se preparó al 10% de acrilamida/bisacrilamida, 0.1% SDS; y el gel concentrante se preparó al 4% de acrilamida/bisacrilamida con un 0.1% SDS. Dicho gel se añadió alrededor de la banda de la 1D. Como ánodo se utilizó el tampón A-SDS (0.2M pH 8.9 tris-HCl) y como cátodo el tampón C-SDS (0.1M Bis-Tris/ 0.1M tricina a pH 8.2 conteniendo un 0.1% de SDS). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y a 80 V durante 24 horas.

12. *ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO*

Los posibles efectos de las variantes genómicas encontradas fueron analizados usando el algoritmo de predicción Splice Site Finder (www.UMD.be/SSF). El servidor Mfold fue usado para el análisis de la estructura secundaria y estabilidad de los ARNs mutantes (237). El programa phosphosite (<http://www.phosphosite.org>), un recurso de libre disposición en la red, fue utilizado para el estudio de las modificaciones post-traduccionales.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. *CRIBADO MUTACIONAL Y SECUENCIACIÓN DEL GEN PYGM*

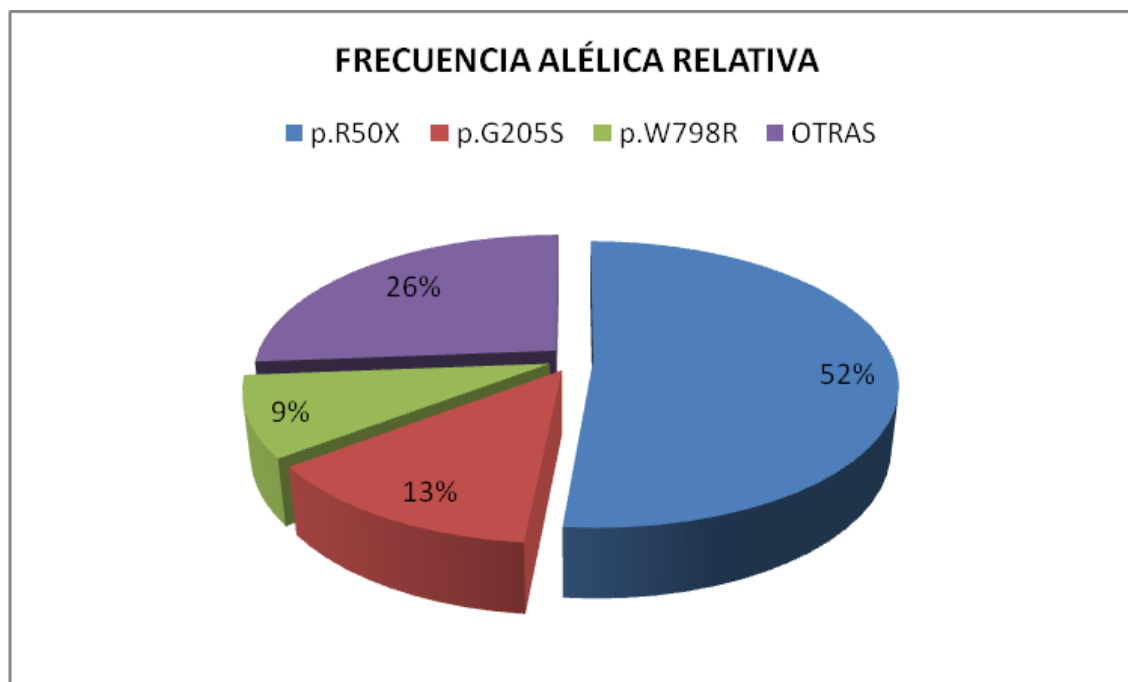


FIGURA 40. Frecuencias alélicas de las tres mutaciones más frecuentes en la serie de 42 pacientes estudiados.

Se llegó al diagnóstico molecular de 42 nuevos pacientes con la enfermedad de McArdle durante el periodo comprendido entre el 1 de enero de 2007 al 31 de octubre de 2010 (Tabla XII). Los resultados obtenidos mediante el cribado mutacional de las tres mutaciones más frecuentes del gen PYGM mostraron que la mayoría de los pacientes presentaron la mutación p.R50X en estado homocigoto (12/42) o heterocigoto (19/42), representando el 51% de los alelos estudiados (IC 95%: 40.2%-61.8%). La mutación de sentido equivocado ("missense") p.G205S se encontró en 6 pacientes en homocigosis y 5 en heterocigosis, apareciendo en un 13% de los alelos de esta serie (IC 95%: 5.6%-20.4%). La mutación privada para la población española p.W798R fue encontrada en 5 pacientes de los cuales 3 resultaron homocigotos, representado así una frecuencia alélica relativa del 9,5% de los alelos estudiados (IC 95%: 5.3%-13.7%). De esta manera, se diagnosticaron genéticamente tras el cribado de las tres mutaciones más comunes el 55% de los pacientes (IC95%: 39.6%-70.4), (figura 40).

ALELO 1	ALELO 2
p.G205S (86)	p.Q176_M177insVQ (104)*
p.R50X (86)	p.V657_G726del (104)*
p.R50X (86)	p.K215K (104)*
p.R771PfsX33 *	p.R771PfsX33 *
p.M442K *	p.M442K *
p.R576X (88)	p.G136AfsX159 *
p.R50X (86)	p.G205S (86)
p.G205S (86)	p.G205S (86)
p.R50X (86)	p.W798R (87, 132)
p.R50X (86)	p.L354P (109)
p.G205S (86)	p.G205S (86)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.G455R (113)
c.1768 +1g>a (117)	c.1768 +1g>a (117)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.N685Y (125)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.L5VfsX22 (89)	p.K754NfsX49 (129)
p.W798R (87, 132)	p.W798R (87, 132)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.G205S (86)	c.1768 +1g>a (117)
p.R50X (86)	p.W388SfsX34 (111)
p.R50X (86)	p.E383K (82)
p.R50X (86)	p.R94W (99)
p.R50X (86)	p.R715W (80)
p.R50X (86)	p.L578P (120)
p.R50X (86)	p.W798R (87, 132)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.G205S (86)
p.G205S (86)	p.G205S (86)
p.R50X (86)	p.576X (88)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.715W (80)
p.W798R (87, 132)	p.W798R (87, 132)
p.R50X (86)	p.R50X (86)
p.R50X (86)	p.A660D (123)
p.R50X (86)	p.R270X (106)
p.R50X (86)	p.R194W (102)

TABLA XII. Tabla de las mutaciones en el gen *PYGM* de pacientes de la serie de 42 pacientes caracterizados con la enfermedad de McArdle. *: Mutaciones nuevas descritas en este trabajo en el gen *PYGM*. Entre paréntesis se muestran las referencias de los trabajos dónde previamente se identificaron las mutaciones señaladas.

2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS VARIANTES PATOGENICAS EN EL GEN PYGM

En el paciente 1 (tabla XIII), tras el cribado de las tres mutaciones más comunes por PCR-RFLP, se encontró el cambio p.G205S en estado de heterocigosis. Seguidamente, la secuenciación del gen *PYGM* a nivel de *ADNg* procedente de sangre total, mostró un cambio en heterocigosis hasta ahora no descrito, la transición de un nucleótido en una zona intrónica, c.529-8g>a (figura 42A). Este cambio está localizado en una posición no conservada de la zona aceptora de corte y empalme de exones (“*splicing*”) del intrón 4. Se confirmó por PCR-RFLP amplificando un fragmento de 399 pb que incluía el exón 5 que se digirió con *Bsu* 36I (figura 41). Se descartó la presencia de la nueva mutación en 200 controles.

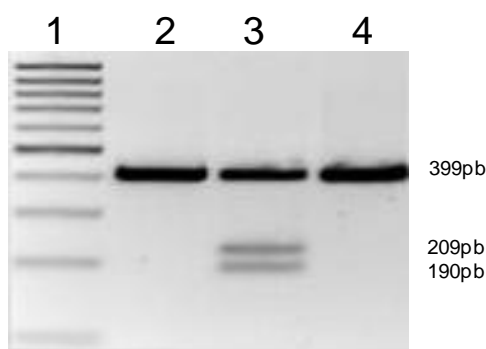


FIGURA 41. Digestión correspondiente a la PCR-RFLP del exón 5. Confirmación de la presencia de la mutación c.529-8g>a la cual genera un sitio de restricción para la enzima *Bsu* 36I, ya que reconoce la secuencia CC / TNAGG. Calle 1: marcador de peso molecular, calle 2: producto de PCR del paciente sin digerir, calle 3: paciente, calle 4 control.

Se analizaron bioinformáticamente con el algoritmo “*Splice Site Finder*” 1000 nucleótidos de la secuencia del gen *PYGM* que incluían desde el exón 2 hasta exón 6 del mismo con sus correspondientes intrones. El programa encontró que la nueva secuencia correspondiente a la zona de la mutación podía tener dos posibles funciones:

- i) una nueva secuencia donadora para el *splicing*: ag/gtgcag, con una valoración (“*score*”) de 66 puntos frente a 92 de la secuencia natural donadora.
- ii) Una nueva secuencia aceptora: ctgacctgccttag/g, con una valoración de 76 puntos frente a 79 de la secuencia natural aceptora.

Para estudiar el posible efecto a nivel transcriptómico del alelo c.529-8g>a, se amplificó y clonó el ADNc procedente del músculo del paciente. El resultado obtenido mostró una retención de los últimos 6 nucleótidos correspondientes al extremo 3' del intrón 4 (figura 42B).

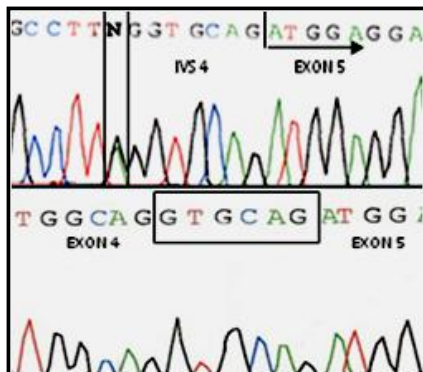


FIGURA 42A. Electroferograma del paciente 1, con la sustitución intrónica en heterocigosis, c.529-8g>a en el gen *PYGM* (ADNg).

FIGURA 42B. Electroferograma del paciente 1, con la retención de 6 nucleótidos observada en la secuencia del ADNc obtenido de tejido muscular.

Se estudió la secuencia de ADNc en 30 clones, de los cuales el 80% mostró la presencia de la mutación p.G205S y el 20% restante la inserción correspondiente a las 6 pb retenidas, GTGCAG.

Posteriormente la cuantificación relativa de ARNm del gen *PYGM* en el músculo del paciente mediante PCR a tiempo real mostró una sobreexpresión de transcritos de un 156 % respecto al valor medio de controles.

Paciente	ADNg Alelo 1	Alelo2	ADNc Alelo1	Alelo2	Expresión Relativa
1	p.G205S c.613G>A	c.529-8 g>a	p.G205S	p.Q176_M177insVQ	154%
2	p.R50X c.148C>T	NI	WT	Exón 17 skipping	3%
3	p.R50X c.148C>T	p.K215K c.645G>A		p.K215K*	5%
4	p.R771PfsX33 c.2310_2311dupCC	p.R771PfsX33 c.2310_2311dupCC		p.R771PfsX33*	40%
5	p.M442K c.1325T>A	p.M442K c.1325T>A	NA	NA	NA
6	p.R576X c.1726C>T	p.G136AfsX159 c.407delG	NA	NA	NA

TABLA XIII. Mutaciones identificadas en el ADNg y en el ADNc obtenido de músculo de los pacientes estudiados. *: ADNc en aparente estado de homocigosis; NI: no identificado; NA: muestra de músculo no disponible.

En el paciente 2, se identificó la mutación p.R50X en uno de sus alelos mediante el análisis del ADN genómico. La secuenciación del resto del gen, no logró la identificación de ninguna otra mutación (tabla XI). Dado que la enfermedad de McArdle es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, se trató de identificar

una segunda mutación en el otro alelo, amplificando y secuenciando el ADNc del paciente. Mediante esta estrategia se observó la ausencia del exón 17 (figura 43).

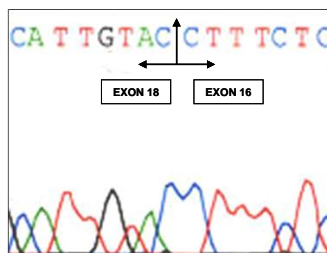


FIGURA 43. Electroferograma del estudio del ADNc, en el cual se observó la ausencia del exón 17, en la secuencia perteneciente al paciente 2.

Para averiguar si la ausencia del exón 17 era producida por un error durante el procesamiento del mensajero del gen *PYGM* o si era debida a una alteración en el propio genoma del paciente, se realizó una amplificación del ADN genómico mediante una *PCR larga* o *de amplio rango* que abarcaba desde el intrón 14 hasta el intrón 18. De esta forma, se obtuvieron dos fragmentos, uno correspondiente al tamaño esperado de aproximadamente 4.5 Kb y uno de menor tamaño de unas 3.5 Kb, (figura 44).

Ambos amplicones fueron purificados tras separación con electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y secuenciados. Se mapeó la delección del exón 17 siguiendo una estrategia de “*primer-walking*”, gracias a la utilización de parejas de oligonucleótidos internos solapados. Estos estudios demostraron la presencia de una delección en la secuencia nucleotídica de 1094 pb, c.(1969+214)_(2177+369)del, que incluye una parte de los intrones adyacentes al exón 17, y que, estaba flanqueada en los puntos de ruptura (“*break-points*”) por la secuencia repetida directa (“*direct-repeat*”) “agacca” (figura 45).

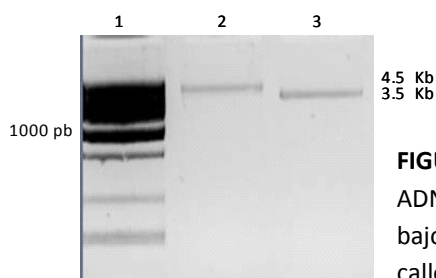


FIGURA 44. Electroforesis de la PCR larga (“*Long-Range PCR*”) en el ADN genómico del paciente 2 tras la purificación por gel de agarosa de bajo punto de fusión. Calle 1: marcador de peso molecular de 1Kb, calle 2: clon wild-type, calle 3: mutante.

En este paciente, la cuantificación de los transcritos musculares del gen *PYGM* por PCR a tiempo real puso de manifiesto una marcada reducción de la expresión relativa de los mismos (3% respecto al valor medio de controles).

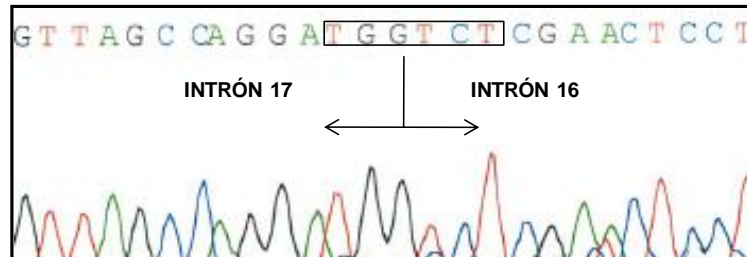


FIGURA 45. Esquema de la delección de las 1094 pb en el paciente 2 obtenida mediante PCR larga del ADNg en el gen *PYGM*.

En el paciente 3 se observó la mutación p.R50X en estado de heterocigosis. La secuenciación completa del gen *PYGM*, reveló la ausencia presencia de un polimorfismo silente, c.645G>A, p.K215K en el exón 5 (figura 46). Esta transición nucleotídica está localizada a 16 nucleótidos del extremo 3' del exón. La amplificación y secuenciación del ADNc del paciente mostró, en aparente estado de homocigosis, el cambio c.645G>A.

Por otra parte, la expresión relativa del gen cuantificada mediante PCR a tiempo real reveló una disminución muy significativa en el porcentaje de los niveles del transcrito correspondiente a este paciente (5% respecto al valor medio de controles sanos). El clonaje de los transcritos de este paciente no pudo llevarse a cabo por la imposibilidad de conseguir una segunda biopsia muscular.

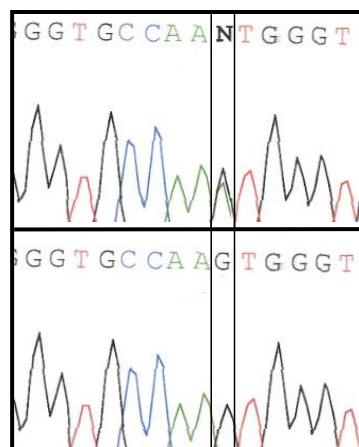


FIGURA 46. Electroferograma del ADNg mostrando la mutación c.645G>A en heterocigosis en el exón 5 del gen *PYGM* del paciente 3. En la parte inferior la secuencia normal correspondiente

Mediante análisis bioinformático con el programa *mfold* se estudio la estabilidad del ARNm que portaba esta nueva mutación (24). Los resultados obtenidos localizaban al nucleótido 645G interaccionando con un uracilo en la posición 725 en la estructura secundaria correspondiente al mensajero (figura 47). Este análisis mostró que la introducción del cambio del nucleótido que portaba el paciente producía una disminución en la energía libre de Gibbs de la estructura.

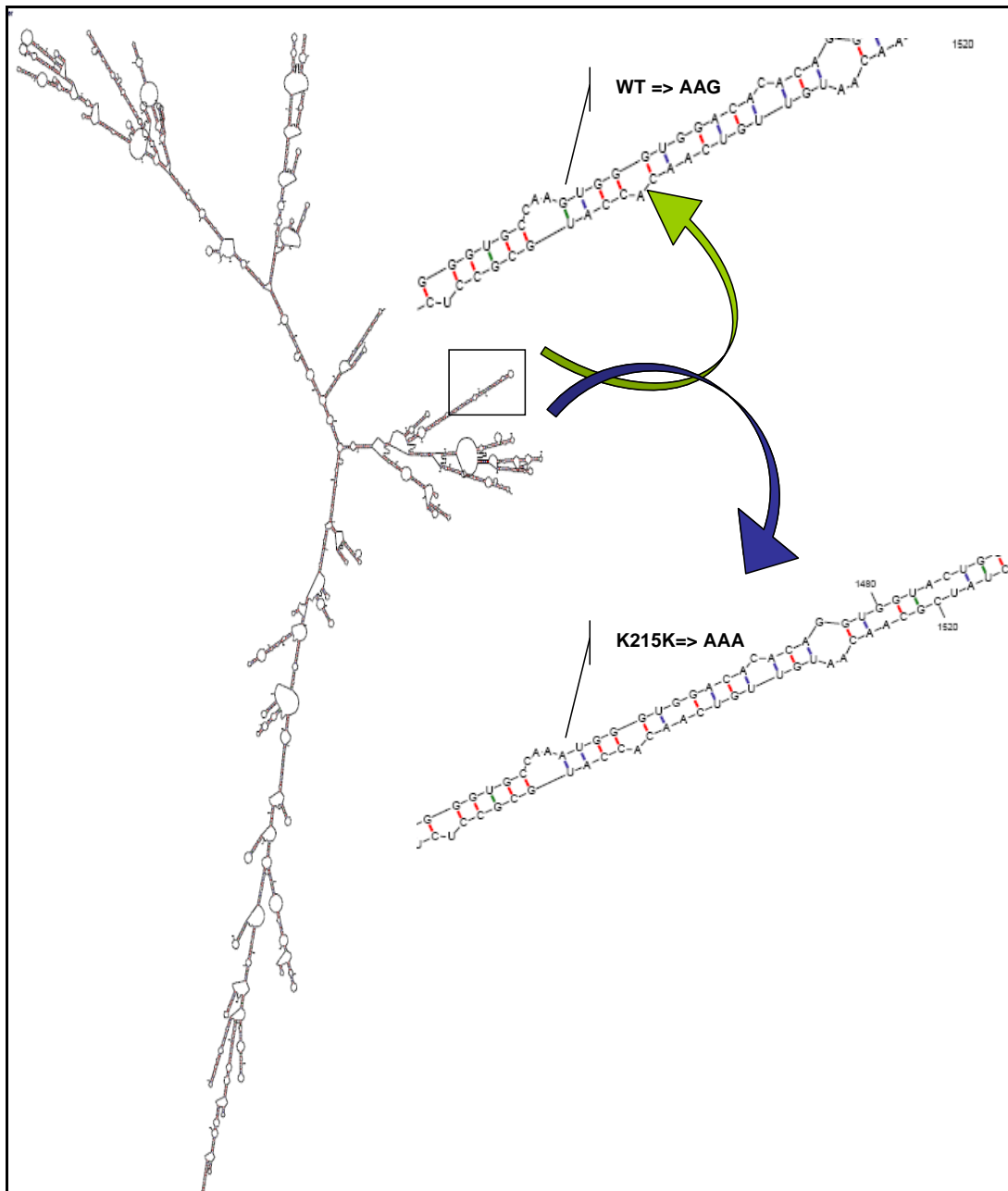


FIGURA 47. Estructura secundaria predicha para el ARN mensajero del gen *PYGM* (programa *mfold*). Localización del nucleótido natural, G (WT: verde), y del nucleótido correspondiente a la mutación p.K215K, A (mutación: azul). El programa predijo una reducción del ΔG para el mRNA mutante: ΔG_{wt} : -1380.3 KJ; $\Delta G_{mutante}$: -1283,2 KJ.

En el paciente 4, tras es el cribado de las tres mutaciones comunes no se encontró ninguna alteración, por lo que, siguiendo el esquema de trabajo (33) (figura 27), se procedió a la secuenciación de los exones con mayor índice mutacional, encontrándose que el paciente portaba en el exón 18, en estado de homocigosis, una duplicación de dos pares de bases, c.2310_2311dupCC (figura 48). Esta alteración se confirmó mediante PCR-RFLP con la endonucleasa *BshTI* (figura 49). La amplificación y secuenciación del ADNc del mismo confirmó esta alteración. Mediante PCR a tiempo real se cuantificaron los transcritos del gen *PYGM* observándose una disminución del 60% respecto al gen control. Esta inserción nucleotídica produjo un cambio en la pauta normal de lectura apareciendo un codón prematuro de terminación, PTC, 33 tripletes después.



FIGURA 48. Electroferograma de la secuenciación de la mutación c.2310_2311dupCC en estado de homocigosis en ADN genómico. En la parte inferior la secuencia natural correspondiente.

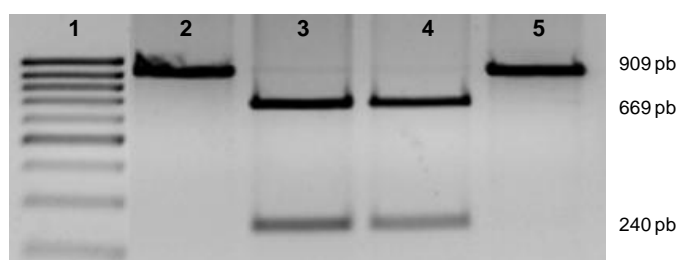


FIGURA 49. Digestión correspondiente a la PCR del exón 18, confirmando la duplicación c.2310_2311dupCC que elimina un sitio de restricción para la enzima *BshTI* ya que reconoce la secuencia 5'...A[^]C C G G T...3'. A la derecha aparece el tamaño de las bandas esperado tras la digestión. Calle 1: marcador de peso molecular, calle 2: control sin digerir; calle 3: control 1; calle 4: control; calle 5: paciente 4.

En el paciente 5, la secuenciación completa del gen permitió la identificación de la mutación de sentido equivocado p.M442K en el exón 11 en homocigosis, caracterizada por la sustitución de una timina en la posición 1325 por una adenina

(figura 50), provocando el cambio de una metionina por una lisina en el codón 442. Para la confirmación de esta mutación se diseñó un protocolo de estudio mediante PCR-RFLP usando el enzima *Nla III* generando un patrón de restricción específico para la secuencia mutante al eliminar un lugar de corte (5'...CATG[^]...3') (figura 51).

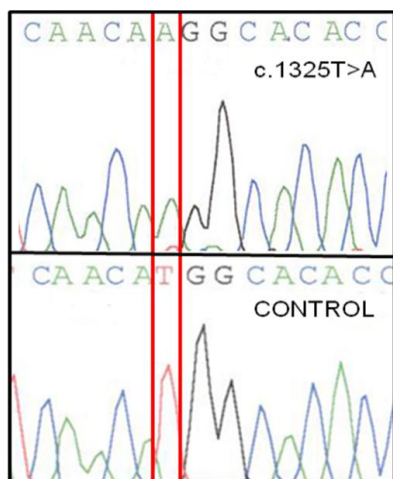
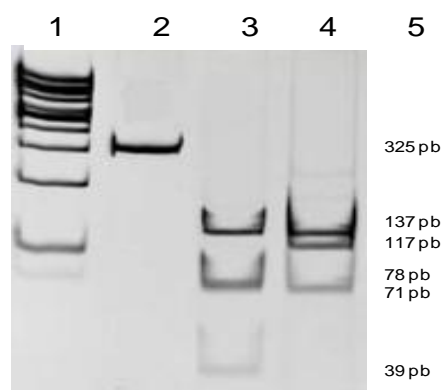


FIGURA 50. Electroferograma de la secuenciación de la mutación c.1325T>A en estado de homocigosis en ADN genómico del paciente. En la parte inferior la secuencia natural correspondiente.

FIGURA 51. Digestión correspondiente a la PCR del exón 11, para la endonucleasa *Nla III* en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 15%. Calle 1: marcador de peso molecular, calle 2: control sin digerir; calle 3: control; calles 4: paciente 5; calle 5: tamaño de las bandas diferenciales según genotipo.



En el paciente 6, se identificaron dos alteraciones genéticas, la mutación nula p.R576X, descrita anteriormente (88) y una nueva mutación con desplazamiento del marco de lectura ("frameshift"), p.G136A (c.407delG), lo que conlleva la aparición de un codón prematuro de terminación en la posición 159 aminoacídica de la proteína (figura 52).

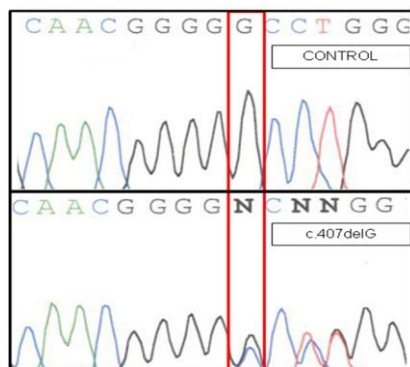


FIGURA 52. Electroferograma de la secuenciación de la mutación c.407delG en heterocigosis en ADN genómico. En la parte superior la secuencia natural correspondiente.

3. *PCR ILEGITIMA DEL GEN PYGM*

Para detectar y cuantificar cantidades mínimas del ARNm del gen *PYGM* se desarrolló una amplificación por PCR del ADNc obtenida a partir del aislamiento de ARN total de sangre periférica. Esta técnica fue empleada en 1988 por Chelly y colaboradores (238), para el estudio del ADNc del gen la distrofina (*DYS*) con el objeto de buscar mutaciones en los enfermos con distrofias musculares de Duchenne y de Becker, reduciendo así el tamaño de la secuencia a analizar. Este mismo grupo en el año 1991, denominó esta metodología con el término “PCR Ilegítima” (239), para describir la técnica que actualmente se emplea para el diagnóstico molecular de otras enfermedades entre ellas, las distrofias musculares de cintura tipo 2A y 2B (240, 241).

3.1. *Estudio de la PCR ilegítima del gen PYGM en sangre periférica*

3.1.1. *Amplificación y secuenciación del ADNc*

Se obtuvo sangre de los pacientes 1, 2, de los hijos de este último (2a y 2b), de un familiar del paciente 3 (3a) y de otros tres pacientes: 7, y su hija 7a, y los pacientes: 8 y 9. El diagnóstico molecular en ADNc se refleja en la tabla XIV.

Pacientes	ADNg Alelo 1	Estado	Alelo 2	Estado
1	p.G205S	Heterocigosis	p.Q176_M177insVQ	Heterocigosis
2	p.R50X	Heterocigosis	p.V657_G726del	Heterocigosis
2a	p.R50X	Heterocigosis	Negativo	Normal
2b	Negativo	Normal	p.V657_G726del	Heterocigosis
3a	Negativo	Normal	p.K215K	Heterocigosis
7	p.R50X	Heterocigosis	p.K215K+p.T488N	Heterocigosis
7a	p.R50X	Heterocigosis	Negativo	Normal
8	p.R50X	Heterocigosis	p.L587P	Heterocigosis
9	p.R50X	Heterocigosis	p.R50X	Heterocigosis

TABLA XIV. Mutaciones identificadas en el ADNc obtenido a partir del ARNm de sangre total periférica en los pacientes 1, 2, de los hijos de este (2a y 2b); del pariente directo del paciente 3 (3a); del paciente 7 y su hija (7a); y de los pacientes 8 y 9 observadas en el ADNg obtenido de sangre total periférica. (a): pariente directo.

Se amplificó y secuenció el ADNc del gen *PYGM* a partir del ARN total de sangre periférica, en 6 fragmentos solapados de diferentes tamaños. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XIV. Para el paciente 1 se observó en el ADNc procedente de sangre los mismos resultados que aquellos obtenidos en músculo; ambas mutaciones, p.G205S y p.Q176_M177insVQ, se encuentran en estado de heterocigosis lo que parece indicar que estos mensajeros sufren los mismos procesos de maduración, que en el tejido natural de expresión de la miofosforilasa, el músculo esquelético.

Sin embargo, en las secuencias respectivas de los estudios a nivel de ADNc procedente de sangre de los pacientes 2, 7, 7a, y 8, se observó la mutación nula (“*nonsense*”) p.R50X en estado de heterocigosis y, en el paciente en 9, en homocigosis. Estos resultados no fueron concordantes con los observados en los mensajeros obtenidos a partir del ARN de músculo, donde las mutaciones portadoras de PTC no se detectaron (tabla XV). Además en el paciente 2, en cuya secuencia de ADNc de músculo se había observado la delección del exón 17 en homocigosis, se detectó en heterocigosis mediante “PCR ilegítima” en sangre. Los hijos del paciente 2 (2a y 2b) portaban las mutaciones p.R50X y c.(1969+214)_(2177+369)del, respectivamente, en estado de heterocigosis, hecho que se observó tanto a nivel genómico como a nivel de ADNc de sangre. El familiar directo del paciente 3 presentó en estado de heterocigosis la variante sinónima p.K215K, tanto en la secuenciación de ADN genómico como a nivel de ADNc procedente de sangre.

P	ADNg						ADNc Músculo						ADNc Sangre					
	Alelo1	Est	Alelo2	Est	Alelo1	Est	Alelo1	Est	Alelo2	Est	Alelo1	Est	Alelo1	Est	Alelo2	Est	Alelo1	Est
1	c.613G>A p.G205S	HE	c.529-8 g>a p.Q176_M177ms VQ	HE	c.613G>A p.G205S	HE	c.613G>A p.G205S	HE	c.529-8 g>a p.Q176_M177ms VQ	HE	c.613G>A p.G205S	HE	c.613G>A p.G205S	HE	c.529-8 g>a p.Q176_M177ms VQ	HE	c.613G>A p.G205S	HE
2	p.R50X c.148C>T	HE	c.(1969+214)_(2177+369)del	HE	NI	HE	NI	HE	Skipping E17	HO	p.R50X c.148C>T	HE	p.R50X c.148C>T	HE	Skipping E17	HE	p.R50X c.148C>T	HE
2a	p.R50X c.148C>T	HE	NI	HE	NA	HE	NA	HE	NA	HE	p.R50X c.148C>T	HE	p.R50X c.148C>T	HE	NI	HE	p.R50X c.148C>T	HE
2b	NI	HE	c.(1969+214)_(2177+369)del	HE	NA	HE	NA	HE	NA	HE	NI	HE	NI	HE	c.(1969+214)_(2177+369)del	HE	NI	HE
3a	NI	HE	p.K215K c.645G>A	HE	NA	HE	NA	HE	NA	HE	NI	HE	NI	HE	p.K215K c.645G>A	HE	NI	HE
7	p.R50X c.148>T	HE	p.K215K+p.T488N	HE	NA	HE	NA	HE	NA	HE	p.R50X c.148C>T	HE	p.R50X c.148C>T	HE	p.K215K+p.T488N	HE	p.R50X c.148C>T	HE
7a	p.R50X c.148>T	HE	NI	HE	NA	HE	NA	HE	NA	HE	p.R50X c.148C>T	HE	p.R50X c.148C>T	HE	NI	HE	p.R50X c.148C>T	HE
8	p.R50X c.148C>T	HE	p.L587p	HE	NA	HE	NA	HE	NA	HE	p.R50X c.148C>T	HE	p.R50X c.148C>T	HE	p.L587p	HE	p.R50X c.148C>T	HE
9	p.R50X c.148C>T	HO		HE	NA	HE	NA	HE	NA	HE	p.R50X c.148C>T	HO	p.R50X c.148C>T	HO		HE	p.R50X c.148C>T	HE

TABLA XV. Resultados obtenidos mediante la amplificación de los ADNc procedentes del ARN total de músculo y sangre periférica procedente de pacientes y familiares directos de los mismos (2a, 2b, 3a y 7a). HE: heterocigosis; HO: Homocigosis; NI: no identificado; NA: muestra de músculo no disponible.

3.1.2. Cuantificación relativa de los mensajeros mediante PCR a tiempo real

Se compararon los niveles de expresión del gen *PYGM* en tejido muscular frente a los obtenidos de sangre periférica total de los pacientes de los que se disponía muestra mediante un ensayo de PCR a tiempo real (figura 53).

Los niveles de los transcritos de la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa se midieron respecto a los niveles de transcritos del gen de referencia de la ciclofilina A (PPIA).

En el paciente 1, parecía existir una sobre-expresión de los transcritos procedentes del gen *PYGM*, debido a que se obtuvieron niveles similares en ADNc de sangre y músculo esquelético.

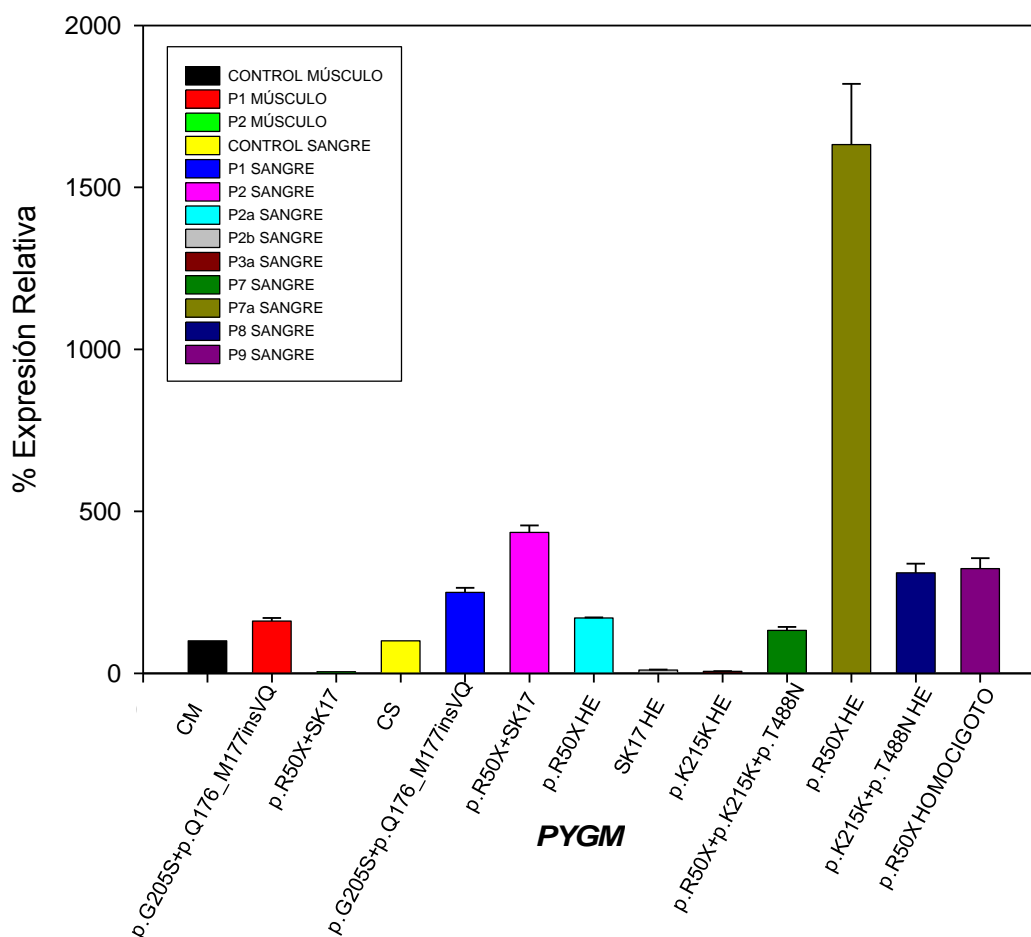


FIGURA 53. Resultados de la cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real del ADNc procedente del ARN total del gen *PYGM* extraído de pacientes con la enfermedad de McArdle y parientes directos a partir de músculo esquelético (1,2,3) y de sangre periférica (4-13).

Para el paciente 2 los niveles de expresión en músculo fueron apenas detectables, 3%, respecto a los controles, aunque parecía que no ocurría lo mismo en sangre, dónde el número de transcritos fueron incluso más elevados que en los controles, $435 \pm 21\%$. El hijo de este paciente, 2a, heterocigoto para la mutación p.R50X mostró niveles de mensajeros del gen *PYGM* en sangre más aumentados que los controles, $170 \pm 2\%$, lo que contrastó con los resultados obtenidos para su hermano, P2b, portador en uno de sus alelos de la mutación c.(1969+214)_(2177+369)del, en el cual los niveles de expresión caían hasta el $10 \pm 1\%$.

El nivel de mensajeros en sangre periférica en el familiar del paciente 3, 3a, se encontró muy disminuido respecto a controles, $5,8 \pm 0,8 \%$.

Los niveles de expresión del gen *PYGM* en el resto de los pacientes, p7, su hijo, P7a, y pacientes P8 y P9 se hallaron muy por encima de las cifras obtenidas en los niveles de los obtenidos para los controles.

3.1.3. Identificación y caracterización de una nueva variante patogénica en el gen *PYGM* utilizando ARNm procedente de sangre periférica

La PCR ilegítima del gen *PYGM* permitió la clonación y secuenciación del alelo portador de la variante sinónima p.K215K, a partir de la sangre periférica de su familiar directo del paciente 3. Mediante esta técnica se encontró que este cambio nucleotídico parecía provocar la retención del intrón 6 en el extremo 3' del exón 6 (figura 54), y del intrón 7 en el extremo 3' del exón 7. Esta alteración de la secuencia del ADNc generaría un codon prematuro de terminación a 17 nucleótidos en el extremo 5' del comienzo del intrón 6 que quedaba retenido.

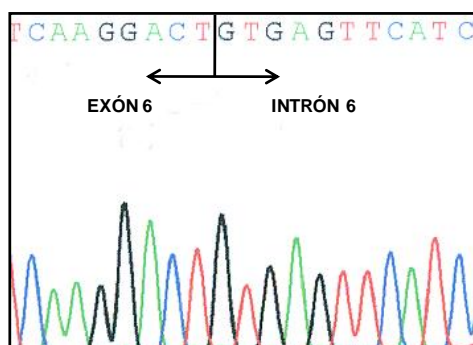


FIGURA 54. Electroferograma del ADNc procedente del ARNm del gen *PYGM*, mostrando la retención del intrón 6 como consecuencia del cambio c.645G>A en el familiar directo del paciente 3.

El estudio de esta variante sinónima no pudo realizarse con anterioridad debido a la falta de muestra, ya que no se pudo obtener una nueva biopsia del paciente 3 para proseguir con los estudios a nivel de ADNc muscular.

3.1.4. Identificación del subtipo de célula sanguínea procedente de la PBMC en la cual se expresan los transcritos del gen *PYGM*

Se aislaron monocitos de sangre periférica procedente de controles sanos, correspondientes a la subpoblación CD14⁺ de la fracción de células mononucleadas (PBMC). Se obtuvo el ARNm del gen *PYGM* de cada fracción, CD14⁺ y CD14⁻, y se amplificó y secuenció el ADNc correspondiente. Se utilizó como control de la técnica el gen ubicuo *PBGD* que codifica la porfobilinógeno desaminasa amplificándose de manera paralela. Los resultados mostraron que no parece existir una subpoblación sanguínea única en la cual se exprese el gen *PYGM* (figura 55). Esto no ocurre en otras proteínas de musculo esquelético adulto como la disferlina que se expresa únicamente en monocitos (242).

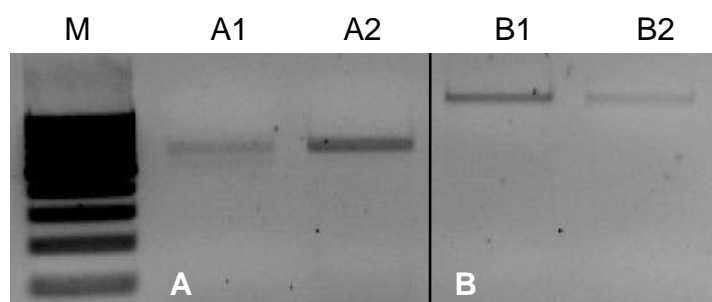


FIGURA 55. PCR del ADNc correspondientes a las dos subpoblaciones aisladas CD14⁺, monocitos (A1 y B1), y CD14⁻, linfocitos (A2 y B2). A) Imagen correspondiente a la amplificación del fragmento 1 del gen *PYGM*. B) Fragmento amplificado del gen *PBGD* (dilución 1/5).

3.2. Estudio de la PCR ilegítima del gen *PYGM* en fibroblastos

Siguiendo la metodología anterior se confirmó la presencia de transcritos correspondientes al gen *PYGM* en cultivos primarios de fibroblastos de controles. En la figura 56 se observa la amplificación de uno de los fragmentos correspondientes al gen *PYGM*, que fue secuenciado, verificándose que el mensajero correspondía a dicho gen.

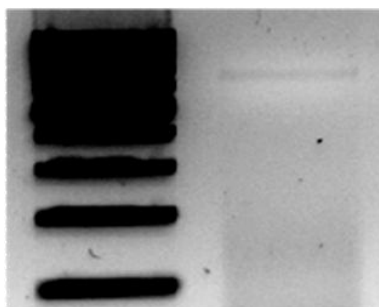


FIGURA 56. PCR del fragmento 1 del gen PYGM amplificado a partir del ADNc del ARN total obtenido de fibroblastos de un control sano.

3.3. *Expresión de la GP muscular en diferentes tejidos*

Para comprobar si los transcritos “ilegítimos” expresaban la proteína miofosforilasa, se estudió mediante la técnica de western blot los niveles de la glucógeno fosforilasa muscular en sangre y fibroblastos de controles sanos, tejidos en los cuales se había estudiado la expresión ilegítima del gen *PYGM*. En la figura 57, se observa la ausencia de la banda correspondiente al peso molecular de la miofosforilasa (97 KDa) en sangre y en el homogenado total proteico obtenido a partir de fibroblastos; la proteína únicamente se detectó a niveles cuantificables en músculo esquelético adulto. Se utilizaron como control de carga α -tubulina en el caso del músculo y β -actina para las proteínas obtenidas de sangre periférica y de fibroblastos.

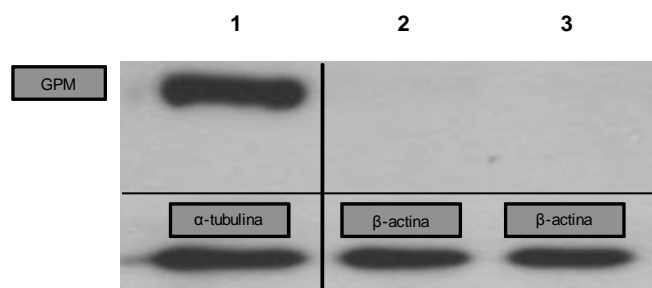


FIGURA 57. Inmunoblot correspondiente a la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa. Calle 1. GP muscular procedente de músculo con la α -tubulina correspondiente como control de carga. Calle 2. Extracto proteico a partir de sangre periférica total de un control sano con β -actina como referencia de carga. Calle 3. Homogenado total de fibroblastos control con β -actina como referencia de carga.

4. ESTUDIO DE LA GP MUSCULAR EN PACIENTES CON McARDLE

Se realizó el estudio mediante western blot de la isoforma muscular de la GP de 17 pacientes con diagnóstico genético de enfermedad de McArdle. Estos pacientes independientemente de las alteraciones genéticas que presentaban (tabla XVI) no mostraron una actividad enzimática detectable para la glucógeno fosforilasa en homogenado muscular. Del remanente de homogenado almacenado a -80°C , se utilizaron 50 μg de proteínas para la inmunodetección.

PACIENTE	Alelo1	Alelo 2
3	p.R50X	p.K215K
4	p.R771WfsX33	p.R771WfsX33
10	p.W798R	p.W798R
11	p.R50X	p.R50X
12	p.R50X	p.W798R
13	p.R50X	p.R94W
14	p.R50X	p.A365V
15	p.R50X	p.K754fsX49
16	p.R50X	p.L5VfsX22
17	p.G205S	p.G205S
18	p.R50X	p.E383K
19	p.G174D	p.K609K
20	p.W798R	p.W798R
21	p.R50X	p. R50X
22	p.R50X	p.R50X
23	p.R50X	p.A660D
24	p.R50X	p.R602W

TABLA XVI. Pacientes con la enfermedad de McArdle y genotipado del gen *PYGM* en los que se realizó la inmunodetección de la GPM en homogenado muscular.

No se observaron las bandas esperadas para el tamaño correspondiente a la GP muscular en ninguno de los pacientes estudiados, lo que supondría que está proteína estaría ausente en los pacientes con enfermedad de McArdle independientemente del genotipo. Se utilizó la α -tubulina como control de carga proteica muscular y cada ensayo fue realizado por duplicado (figura 58).

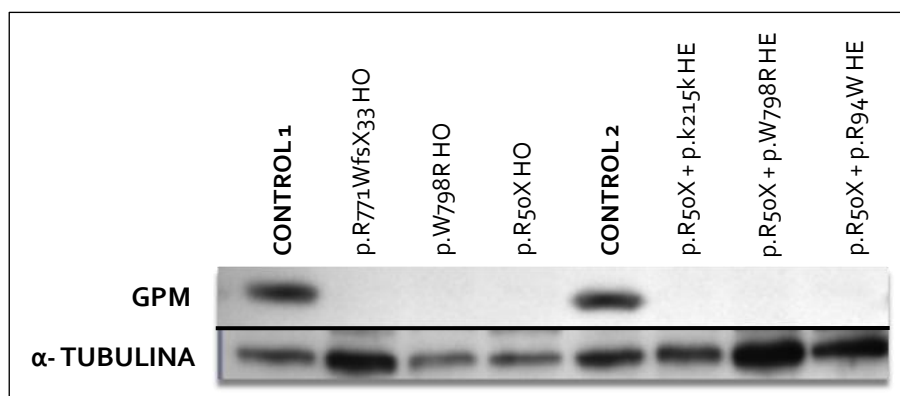


FIGURA 58. Inmunoblot para la proteína GP muscular (anticuerpo policlonal). Calles 1 y 5: Homogenados de músculo esquelético adulto de controles sanos. Calles 2, 3 4, 6, 7 y 8: Homogenados musculares de los pacientes 4, 10, 11, 3, 12 y 13, respectivamente, en los que se observa ausencia total de la GPM (97 KDa). HO: Homocigoto; HE: Heterocigoto. α - tubulina empleada como control de carga de músculo esquelético.

5. ANÁLISIS DEL PERFIL POLISOMAL EN MIOBLASTOS DE PACIENTES CON *McARDLE*

Para ellos se emplearon cultivos de mioblastos diferenciados a miocitos-miotúbulos pertenecientes a un control sano y al paciente 4, homocigoto para la mutación p.R771WfsX33. Las células se lisaron en presencia de cicloheximida, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas al bloquear la elongación de la traducción. De esta manera, se obtuvieron las fracciones correspondientes a las estructuras polisómicas indicadas en la figura 59 ((40S+60S+80S) y fracción polisomal), de las cuales se aislaron los ARNs mensajeros asociados, sujetos a cada una de ellas, las cuales se encontraban, por tanto, en un proceso activo de traducción.

En la figura 59 se muestran los electroferogramas correspondientes a la amplificación del fragmento 4 del ADNc del gen *PYGM* procedente de los mensajeros asociados a la fracción (40S+60S+80S) (figuras 59A y 59B, control y paciente, respectivamente) y la fracción polirribosomal (figuras 59C y 59D, control y paciente, respectivamente). Estos resultados indican que el mensajero del gen de la miofosforilasa se encontraría en la fracción polisomal en un proceso activo de traducción, lo que parece sugerir que la ausencia de GP muscular en los pacientes observada por western blot, se debe posiblemente a un proceso de inestabilidad y no a un fallo post-transcripcional.

Para verificar que los fragmentos pertenecían al paciente 4, se amplificó y secuenció el ADNc del gen *PYGM* procedente del ARN extraído de las fracciones

procedentes del gradiente de sacarosa del cultivo diferenciado de mioblastos, confirmándose que el correspondiente al paciente portaba la mutación c.2310_2311dupCC.

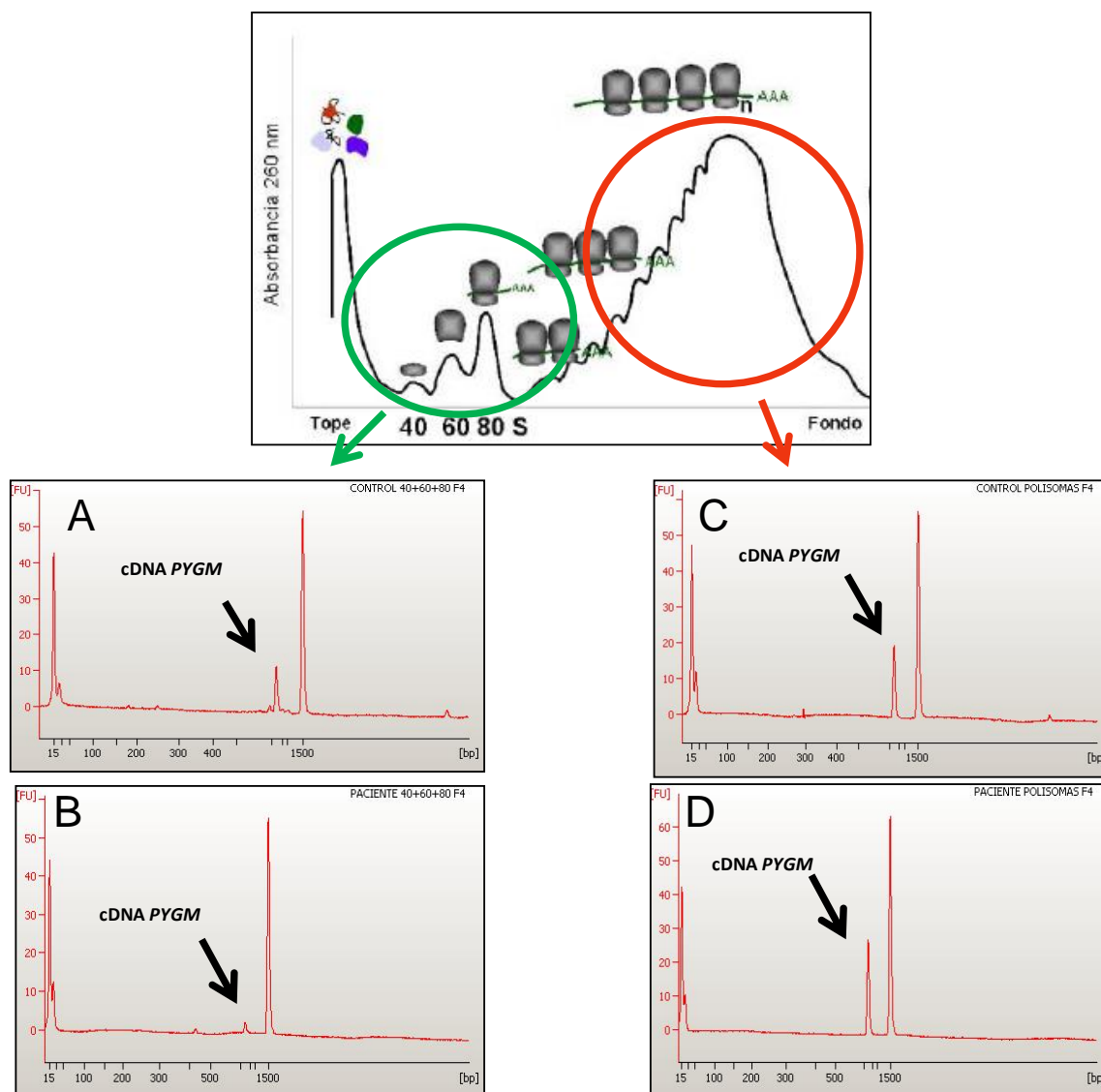


FIGURA 59. Perfiles de polisomas en gradientes continuos de sacarosa. Se recogieron dos fracciones: la fracción de 40S-60S-80S y la fracción polisomal de cada línea celular para extraer el ARNm asociado a estas estructuras. A, B: electroferogramas correspondientes a la PCR de los ADNc (F4) de la fracción (40S+60S+80S) del gen *PYGM* del control y paciente 4, respectivamente. C, D: electroferogramas correspondientes a los ADNc (F4) de la fracción polirribosomal del gen *PYGM* de los mioblastos diferenciados control y paciente 4, respectivamente.

6. ***CARACTERIZACION DE LAS ALTERACIONES PROTEICAS EN LA ENFERMEDAD DE McARDLE***

6.1. ***Análisis monodimensional***

En un trabajo previo de nuestro grupo en colaboración nacional (Nogales-Gadea G. y colaboradores, artículo *in press*), se cuantificó la expresión de algunos genes pertenecientes a vías metabólicas (metabolismo del glucógeno, metabolismo de ácidos grasos, metabolismo de los aminoácidos, metabolismo de los cuerpos cetónicos, metabolismo de la fosfocreatina), diferentes tipos de transportadores (transportadores de glucosa, transportadores mitocondriales de ácidos grasos, transportadores de calcio del retículo sarcoplasmático), factores de transcripción, genes de función mitocondrial (codificados por el ADN mitocondrial, cadena de transporte electrónico de codificación nuclear, defensa antioxidante, dinámica mitocondrial), genes estructurales (organización de la estructura del sarcómero, adhesión, crecimiento, diferenciación, regeneración y receptores del impulso nervioso), genes relacionados con procesos de inflamación, estrés celular y apoptosis.

Entre los genes diferencialmente expresados se encontró *GYS1* que tiene un importante papel metabólico, previamente estudiado en pacientes con enfermedad de McArdle (243). Por otro lado, también se encontraron diferencias en la expresión del gen *ATP2A1*, que codifica la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, SERCA1. Ambos genes estaban infraexpresados en los pacientes de McArdle, con una $p < 0,01$ (datos sin publicar).

Estas proteínas fueron estudiadas en cuatro pacientes con glucogenosis tipo V; los homogenados totales obtenidos a partir de biopsias musculares de bíceps fueron cargados en un gel PAGE-SDS y las proteínas se detectaron mediante anticuerpos específicos para SERCA1 y *GYS1*. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica total ni de la glucógeno sintasa ni de SERCA1 (figura 60). Aunque cabe destacar la aparición de unas bandas de menor peso molecular en el *immunoblot* correspondiente a la *GYS1* que sólo aparecían en las calles correspondientes a los pacientes (figura 60).

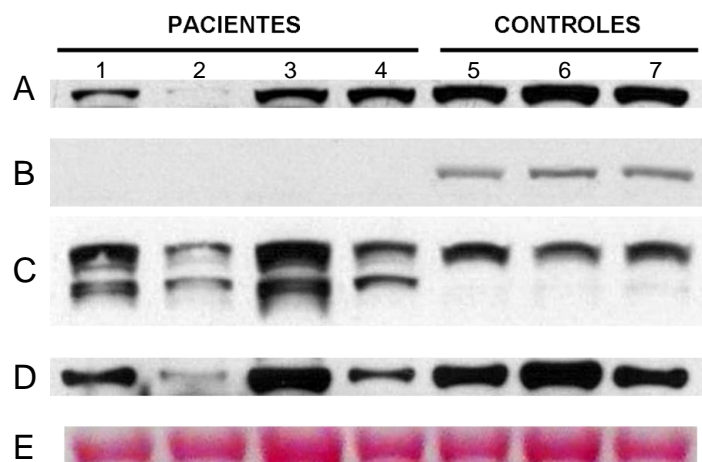


FIGURA 60. Inmunoblot de los pacientes 16 (calle 1), 20 (calle 2), 22 (calle 3) y 23 (calle 4), frente a tres homogenizados obtenidos de músculo de controles sanos (calles 5, 6 y 7). 50 μ g del extracto proteico total fueron cargados para la detección de la SERCA1 (A), GP muscular (B) y la GS (C). Se emplearon la α -tubulina (D) y la miosina (E), y se tiñó la membrana con el colorante rojo ponceau, como control de carga.

6.2. *Análisis bidimensional*

6.2.1. *Deficiencia de las isoformas de GP muscular en los pacientes*

Se realizaron dos parejas de geles PAGE-2D, separando de esta manera la mezcla compleja de proteínas correspondiente a los extractos proteicos de los músculos esqueléticos de 2 controles sanos y 2 pacientes portando las mutaciones p.W798R, P20, y p.R50X, P21, ambas en homocigosis. Las proteínas separadas de esta manera individualmente se tiñeron con azul coomassie coloidal. Tras la adquisición de las imágenes correspondientes, los geles se analizaron con el programa ImageMaster 2D Patinum 7.0 (GE).

En la figura 61 se muestran dos geles bidimensionales representativos del control 1 (A) y del paciente 20 (B) tras la tinción. El análisis informático permitió encontrar la diferencia cualitativa principal entre los geles, de tal manera, que no se detectan los puntos en los geles de los pacientes correspondientes a las coordenadas esperadas de la GP muscular, siendo estas, el punto isoeléctrico, 6.57, y el peso molecular, 97 KDa.

El mapa tridimensional del los control (figura 61C) mostró que además de los picos correspondientes a la forma activa a, e inactiva b, aparecían picos de menor volumen entre ambas isoformas que podrían corresponder a estados intermedios de activación por fosforilación. Una aparecía a pHs más ácidos, izquierda del gel y otra a pHs más básicos, hacia la derecha.

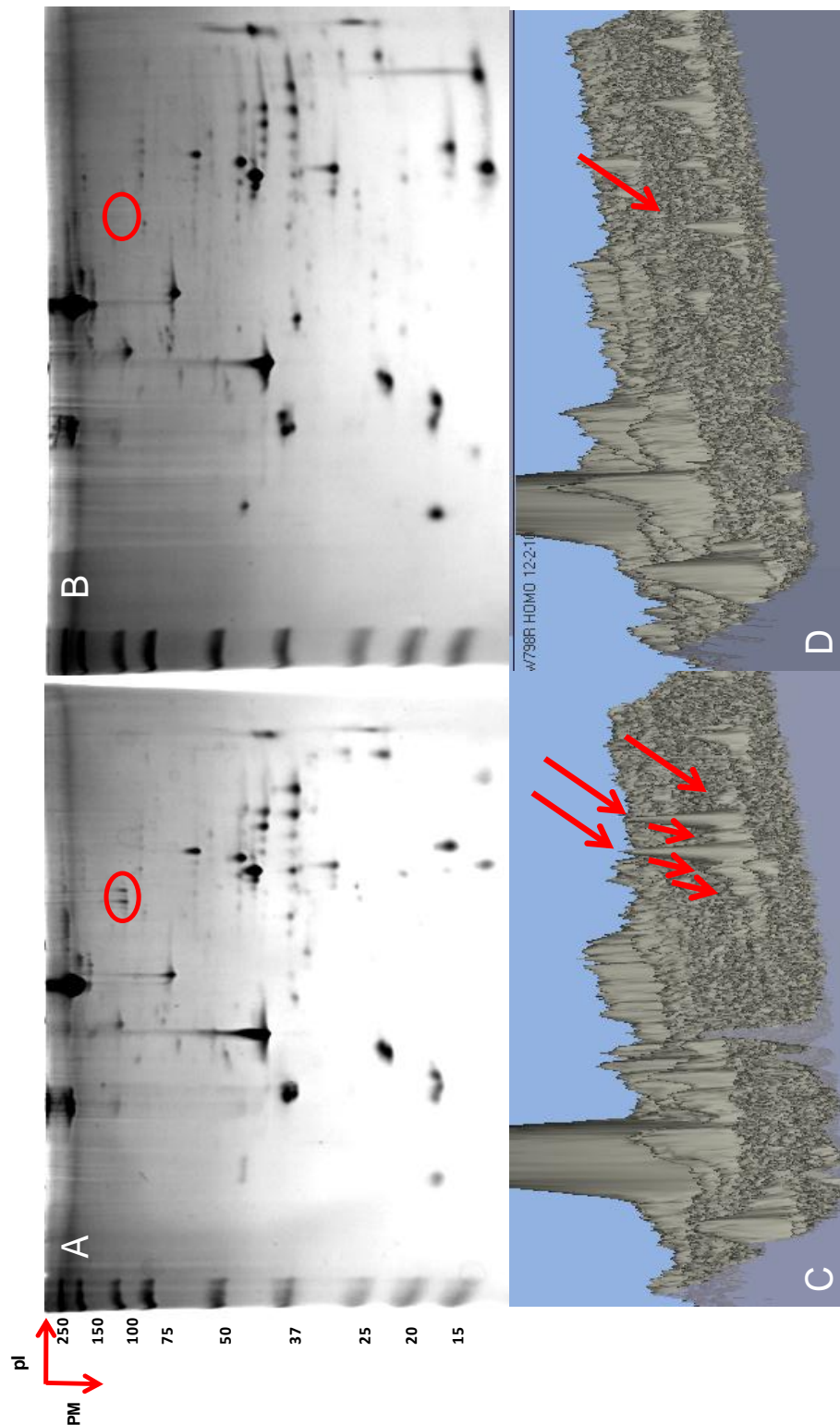


FIGURA 61. Cambios cualitativos en el mapa de expresión proteica de geles bidimensionales de la miofosforilasa. En la parte superior se muestran dos geles representativos teñidos con azul de coomassie de los homogenados totales de músculo esquelético control (A) y del paciente 10 (B). El rango de pH es de 3-11NL (de izquierda a derecha) y cada gel se realizó con 100 µg del homogenado total. En la parte inferior se muestra una ampliación de la zona del gel analizada con el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE) del control (C) y del paciente 20 (D). Las flechas señalan las manchas correspondientes a la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa.

6.2.2. Análisis de la expresión molecular en músculo esquelético adulto mediante PAGE-2D

Los resultados anteriores se validaron mediante inmunodetección. El western blot de la electroforesis bidimensional específico para la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa confirmó los resultados observados previamente con la tinción de los geles PAGE-2D: ausencia de ambas isoformas en los pacientes estudiados 20 y 21, ambos homocigotos para p.W798R y p.R50X, respectivamente (figuras 62c y 62d).

6.2.3. Análisis de la expresión de Glucógeno Sintasa

No parecen existir diferencias significativas en la expresión total de GS en pacientes frente a controles (figura 58). Sin embargo, tanto la GS como la GP se regulan por fosforilación, por tanto, la actividad de estas enzimas podría variar sin ningún cambio en los niveles totales identificados mediante el análisis de *immunoblot* tradicional. La alta resolución de la PAGE-2D, permite separar mezclas complejas en proteínas individuales al combinar dos tipos de características proteicas independientes de manera secuencial: el punto isoelectrico, única para cada proteína, y el peso molecular. Se realizó este tipo de análisis y se combinó con la inmunodetección de la glucógeno sintasa encontrándose diferencias significativas frente a los controles en los dos pacientes estudiados.

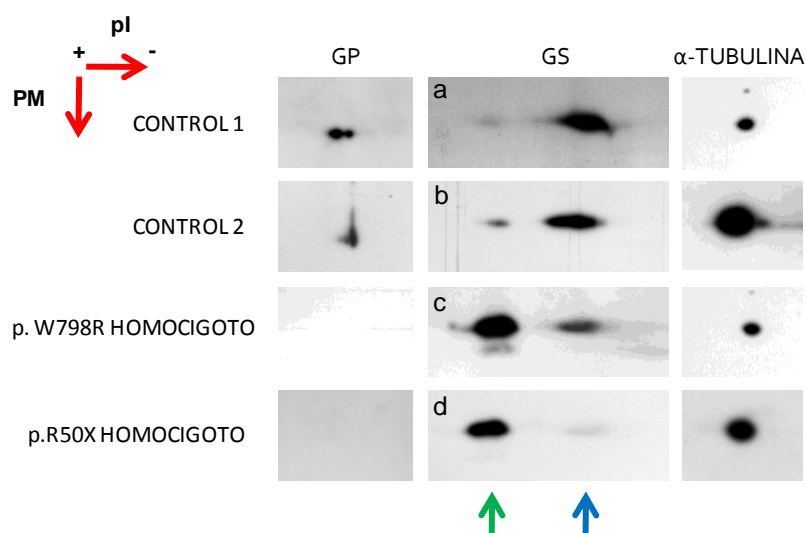


FIGURA 62. Inmunoblot correspondiente a una electroforesis bidimensional de la glucógeno fosforilasa muscular (GP) y la glucógeno sintasa (GS) procedente del homogenado total de músculo esquelético adulto de dos pacientes con la enfermedad de McArdle (c y d), con sus correspondientes controles (a y b).

En la figura 62, se observa el patrón que se obtuvo para GS en los controles (a y b) mientras que para ambos pacientes el cambio fue visible (c y d), apareciendo una señal aumentada hacia la izquierda (verde) y muy disminuida hacia la derecha, hacia

los pHs básicos (azul). Los resultados podrían indicar que la glucógeno sintasa sufre algún tipo de modificación post-traducciona en los enfermos con McArdle; la ausencia de miofosforilasa podría inducir estos cambios, de tal manera, que el incremento en la intensidad de la mancha más ácida podría asociarse como una posible fosforilación.

6.2.4. Análisis de la expresión de SERCA1 en músculo esquelético adulto

Como se mostró en el apartado 6.1, tras la inmunodetección con el anticuerpo específico para la SERCA1 no se observaron diferencias significativas en la cantidad total de la proteína en los pacientes respecto a los controles. Sin embargo, al igual que ocurre con la glucógeno sintasa al emplear una técnica más resolutive como es la electroforesis bidimensional se pudieron apreciar cambios significativos, como es la disminución de la isoforma más básica en los pacientes respecto a los controles (figuras 63 c y d). La isoforma más ácida de esta ATPasa correspondería a la mancha más hacia la izquierda. Estos conjuntos de puntos en líneas horizontales corresponden a una misma proteína en la PAGE-2D debiéndose a modificaciones post-traduccionales que alteran el punto isoelectrico de la proteína estudiada pero no su peso molecular. Estas alteraciones en el patrón de expresión proteica de la SERCA1 en los pacientes con McArdle respecto a los controles podrían deberse a la desaparición de la forma desfosforilada de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético (55).

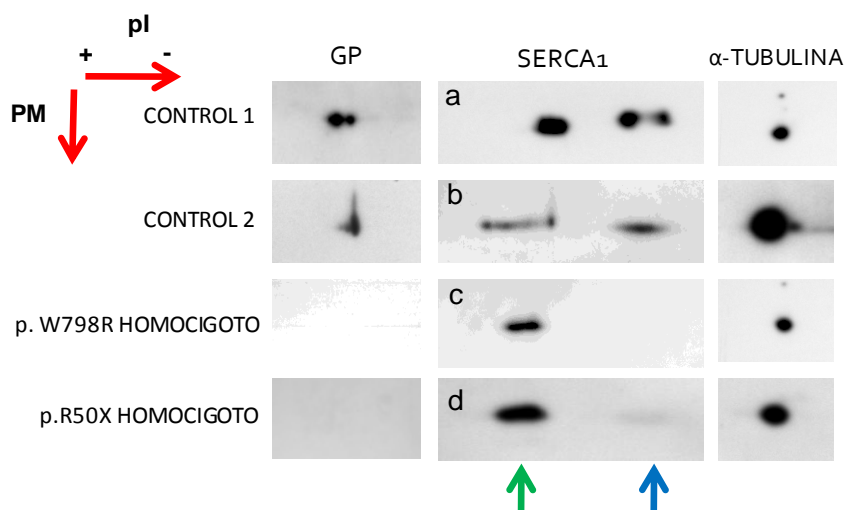


FIGURA 63. Inmunoblot correspondiente a una electroforesis bidimensional de la glucógeno fosforilasa muscular (GP) y la SERCA1 procedente del homogenado total de músculo esquelético adulto de dos pacientes con la enfermedad de McArdle (c y d), con sus correspondientes controles (a y b).

6.3. Análisis bidimensional en condiciones nativas: Colocalizaciones

Carty T.J. y colaboradores (244) ya estudiaron la regulación de la glucógeno fosforilasa, destacando la fosforilación como una de las principales modificaciones post-traduccionales fundamentales en la actividad de la enzima. Pero no sólo la fosforilación es esencial en este sentido sino también asociaciones inter-proteína, ya que la glucógeno fosforilasa podría formar complejos con otras proteínas, como las estudiadas anteriormente, que podrían influir en el correcto funcionamiento de estos en las células musculares. Por este motivo, se realizó el estudio comparativo mediante la técnica de “Blue Native” en músculo esquelético de 2 pacientes con enfermedad de McArdle portadores de las mutaciones p.R50X en homocigosis, paciente 21, y p.R602W y p.R50X ambas en heterocigosis, paciente 24 y dos controles. Se realizó una electroforesis en geles blue-native (BN-PAGE) de primera dimensión en condiciones nativas (1D) con los homogenados totales musculares y una segunda dimensión en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS-2D), en combinación con la técnica de *western blot*. Los análisis mediante inmunoblot fueron realizados con anticuerpos específicos contra la isoformas musculares de la GP, la ATPasa de Ca^{2+} y la glucógeno sintasa.

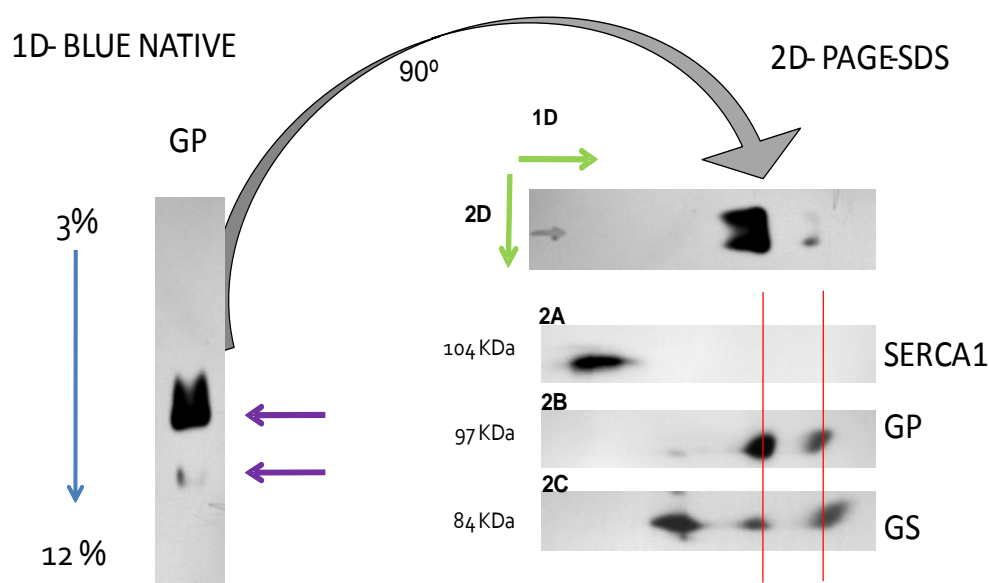


FIGURA 64. Electroforesis *blue native* bidimensional. Izquierda: Primera dimensión (1D) realizada en condiciones nativas y combinada con la inmunodetección de la GP muscular obtenido a partir de 50 μg de proteínas de la fracción citoplasmática de músculo esquelético separadas en un gradiente acrilamida/bisacrilamida del 3-12%. Derecha. Segunda dimensión (2D) realizada en un gel 10% SDS-PAGE en combinación con la técnica de western blot para analizar las diferentes subunidades de los complejos citoplasmáticos en concreto para la GP muscular, SERCA1 y la GS. Para ello una banda de un gel de 1D se corta, se rota 90°C y se inserta en el gel concentrante; las proteínas son separadas posteriormente en el gel separador.

Los resultados para la GP muscular mostraron ausencia de la misma tanto en la 1D como en la 2D para ambos pacientes; en los controles se hallaron varios complejos en las dos dimensiones que podrían indicar las diferentes agrupaciones de la fosforilasa, es decir, el dímero correspondiendo con la señal a menor concentración de acrilamida, y, por tanto, mayor peso molecular, y el monómero con una señal a menor peso molecular (figura 64, 1D y 2A).

El análisis mediante inmunoblot de la PAGE-SDS-2D en estos controles con el objeto de identificar que formas oligoméricas de la GP muscular pudieran estar formando complejos macromoleculares con SERCA1, mostró la presencia de las unidades de SERCA1 en la región de menor porcentaje de acrilamida/bisacrilamida (figura 64 2A) no coincidiendo en peso con las zonas de migración de las diferentes formas de GP muscular, lo que sugeriría una falta de interacción entre ambas proteínas.

Igualmente mediante PAGE-SDS-2D se identificó la presencia en estos mismos controles de 3 formas para la GS que podrían corresponder con el tetrámero, el dímero y el monómero, coincidiendo las 2 últimas en la misma zona de porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que para el dímero y el monómero de la GP muscular (figura 64, 2B y 2C), lo que indicaría una posible colocalización entre ambas proteínas a nivel subcelular.

El estudio de esta colocalización en los pacientes 21 y 24 reveló un patrón cuantitativamente diferente de la GS respecto a los controles (figura 65A). El correspondiente densitometrado de las manchas detectadas mostró que en los pacientes el equilibrio entre las diferentes formas moleculares de la glucógeno sintasa sufría un desplazamiento de la cantidad de dímero y monómero hacia la formación del tetrámero en detrimento de las dos primeras (figura 65B).

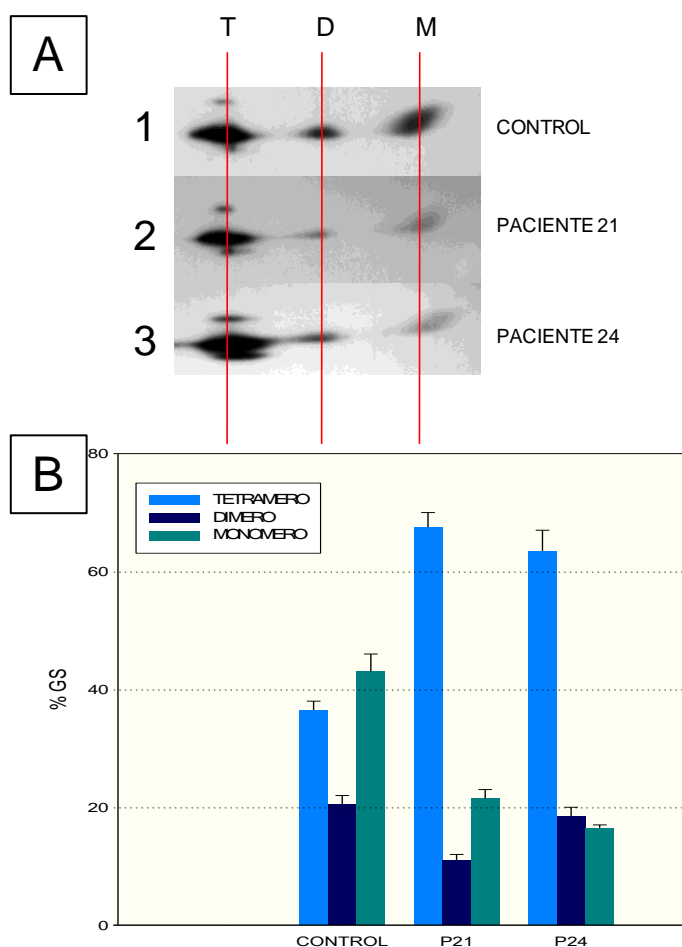


FIGURA 65. Análisis bidimensional de la Glucógeno Sintasa mediante la técnica de *Blue Native* en combinación con western blot. 50 μ g del homogenado total de músculo esquelético adulto fueron analizados tanto en los controles como en los pacientes 21 y 24. A. Inmunoblot de la proteína en PAGE-SDS-2D. T: tetramero; D: dímero; M. monómero. B. Densitometrado de las manchas obtenidas correspondientes a las diferentes formas moleculares de la GS mediante el programa ImageJ para las dos réplicas técnicas del experimento, referidas al 100% de la cantidad total de la proteína en cada muestra considerada individualmente.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio genético-molecular de 42 pacientes de origen español con enfermedad de McArdle incluidos en esta tesis doctoral, confirman la elevada heterogeneidad molecular del gen *PYGM* (136), cuyas alteraciones son responsables de la enfermedad de McArdle. El número de mutaciones descritas hasta la fecha asciende a 136, incluyendo las variantes patogénicas identificadas en este trabajo, que afectan tanto a zonas codificantes como no codificantes. En este sentido, se han descrito mutaciones que abarcan un amplio rango de mecanismos mutacionales como terminadoras, mutaciones con cambio de aminoácido, mutaciones que afectan al corte y empalme de exones, deleciones e inserciones.

La mutación nula p.R50X es la más prevalente en los diferentes grupos de población donde se ha observado, representando el 81% de los alelos mutados en pacientes del Reino Unido (91), el 64% en Estados Unidos (245), el 56% en Alemania (88), el 43% en Italia (81), el 31 % en Holanda (101), el 72% en Francia (80) y entre el 47% y el 55% en estudios previamente realizados en España (100, 246). La segunda mutación más frecuente descrita en el gen *PYGM* es la mutación con cambio de aminoácido p.G205S que representa el 10% de alelos en pacientes americanos y el 9% de alelos en pacientes españoles (86, 100). Sin embargo, tanto la mutación p.R50X como la p.G205S no se han encontrado nunca en pacientes japoneses.

Teniendo en cuenta los resultados del estudio molecular en los 42 nuevos pacientes españoles incluidos en esta tesis, se observan las siguientes evidencias: *i)* la mutación p.R50X es la más común en población española, representando el 71,4% de los pacientes y el 51% de los alelos, *ii)* la mutación p.G205S es la segunda más frecuente apareciendo en el 16,6% de los pacientes y en el 13% de los alelos, *iii)* la mutación p.W798R se observó en el 9.5% de los pacientes y en el 9% de los alelos. Estos resultados de epidemiología molecular de la enfermedad son similares a los obtenidos en estudios anteriores (79, 80, 82, 86, 100, 131, 184, 194, 247). Hasta la fecha, la mutación p.W798R, que se ha descrito únicamente en pacientes españoles (mutación privada de este grupo poblacional), ha sido considerada la segunda más frecuente en esta población (frecuencia alélica 14%) (100, 132); sin embargo, en esta serie se observa que está la tercera en cuanto a frecuencia alélica, siendo la mutación p.G205S, la que ocupa el segundo lugar. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre la distribución alélica de las mutaciones p.G205S y p.W798R.

Con el estudio de estas tres mutaciones se logró caracterizar genéticamente identificando la mutación en cada uno de sus alelos, a 18 pacientes, lo que representa el 43% de la serie estudiada. Además se pudo detectar uno de los alelos mutados en 37 de estos pacientes, lo que en conjunto representa un 88 % del total. Considerando el hecho de que las mutaciones descritas se distribuyen de manera equivalente en las

zonas amino y carboxi-terminal de la proteína, estos hallazgos confirman la importancia del análisis de estas tres mutaciones como una primera aproximación al estudio genético del gen *PYGM* en pacientes candidatos a padecer glucogenosis tipo V.

En esta serie de 42 pacientes (21 hombres y 21 mujeres) con inicio de los síntomas entre 8 y 75 años, y cuya edad de diagnóstico fue muy heterogénea encontrándose entre los 10 y los 70 años, se han encontrado 23 mutaciones diferentes. Diecisiete de ellas se han descrito previamente (p.R50X, p.L5VfsX22, p.R94W, p.R194W, p.G205S, p.R270X, p. L354P, p. E383K, p.W388SfsX34, p.G455R, p.R576X, p.L578P, p.A606D, p.R715W, p.K754NfsX49, p.W798R, c.1768 +1G>A) (80, 82, 86-88, 99, 102, 106, 111, 117, 120, 123, 125, 129, 132). Las 6 restantes se identificaron como nuevas mutaciones durante el desarrollo de este trabajo: p.Q176_M177insVQ, c.(1969+214)_(2177+369)del, p.K215K (104), p.R771PfsX33 (248), p.M442K y p.G136AfsX159. De estas 23 mutaciones, 9 conducen a la aparición directa o indirecta de un codón prematuro de terminación (PTC), 12 son mutaciones con cambio de aminoácido, y 2 afectan al mecanismo de corte y empalme de exones ("splicing"). En cuanto a la distribución estructural de las mutaciones identificadas, 14 se localizaron en la zona N-terminal de la proteína (desde el residuo aminoacídico 1 hasta el 482), la cual contiene la mayoría de los residuos de unión a ligandos y la mayor parte de los residuos que entran en contacto con aminoácidos del otro monómero (residuos de contacto entre dímeros), y 9 mutaciones se hallaron en el extremo C-terminal (residuo 483 hasta el 842) que contiene la mayoría de los residuos del centro activo y los implicados en la unión al piridoxal fosfato (65); por lo que la distribución de las mutaciones encontradas afectó de igual manera a ambos dominios.

Los 6 pacientes portadores de las 6 nuevas mutaciones presentaron la mayor parte de las características clínicas más habituales asociadas con la enfermedad de McArdle, incluyendo episodios de mioglobulinuria. Mediante un cribado inicial por PCR-RFLP de las tres mutaciones más frecuentes, se determinó que el paciente 1 era heterocigoto para la mutación p.G205S, y que los pacientes 2 y 3 presentaban la mutación p.R50X en heterocigosis. Posteriormente mediante secuenciación del gen *PYGM* se pudieron observar 5 nuevas alteraciones genéticas en los alelos que permanecían sin caracterizar por PCR-RFLP: a) una nueva transición nucleotídica en heterocigosis (c.529-8g>a) localizada en una posición intrónica relativamente no conservada en el paciente 1, b) la sustitución c.645G>A en el exón 5 en el paciente 3, que predecía una variante aparentemente neutra pues el codon mutado codificaba para el mismo aminoácido que el codón natural (p.K215K), c) una duplicación de una citosina en el exón 18 en estado de homocigosis c.2310_2311dupCC en el paciente 4, la cual predice un desplazamiento del marco de lectura con la consiguiente generación de un PTC localizado 33 residuos aminoacídicos hacia el extremo carboxi-terminal de la secuencia proteica, d) un cambio nucleotídico en el exón 11, c.1325T>A, en el paciente 5 en ambos alelos, y, e) una microdelección de una guanina, c.407delG, en el paciente

6, que conlleva el desplazamiento del marco de lectura y que predice la aparición de un PTC en el exón 8, a 159 aminoácidos del cambio aminoacídico originado por la microdelección, p.G136AfsX159.

En el paciente 1, el análisis *in silico* de la secuencia del cambio c.529 -8 G>A, localizado en una región no conservada de la zona aceptora 3' del intrón 4, identificó una probable nueva zona aceptora para el *splicing*. Mediante el clonaje del ADNc se demostró que la sustitución c.529-8g>a podía provocar la activación de un sitio críptico de *splicing* en la zona aceptora del intrón 4 (figura 66), debido a que generaba una secuencia consenso de *splicing* (ag/GT). Esta activación conduce a un *splicing* alternativo que provoca la retención de los últimos 6 nucleótidos del extremo 3' del intrón 4 en el extremo 5' del exón 5 (figura 66). Este proceso genera a nivel proteico genera la inserción de 2 aminoácidos lo cual podría modificar la polaridad en esa región de dimerización de la miofosforilasa (65). En la literatura se han descrito en el gen *PYGM* otras mutaciones *in frame*, como la p.V239del en pacientes italianos (249), o la p.F710del (107) en pacientes japoneses, sin embargo, esta mutación es la primera en la que ocurre la inserción de dos aminoácidos en la proteína.

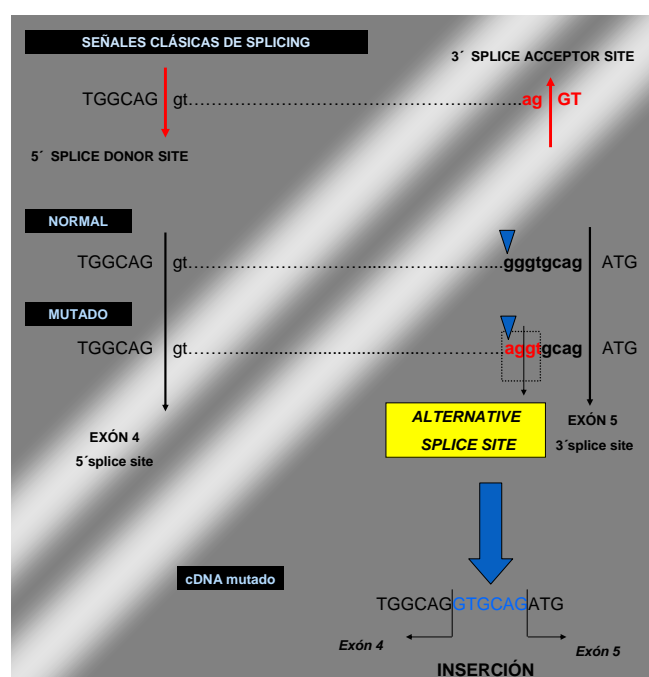


FIGURA 66. Mecanismo de *splicing* alternativo propuesto para la inserción de 6 pb, como consecuencia de la mutación c.529-8G>A.

El paciente 2, heterocigoto para la mutación p.R50X y en el cuál no se encontró ninguna otra alteración por secuenciación del gen *PYGM* en una muestra de ADN genómico, junto con los pacientes 1 y 3 entraron a formar parte del grupo de los denominados “heterocigotos genéticos manifiestos”, ya que estos dos últimos pacientes portaban variaciones genéticas, que en apariencia se clasificarían *a priori*

como polimorfismos. La calificación de “heterocigoto genético manifiesto” ha sido motivo de controversia durante mucho tiempo en lo relacionado con esta enfermedad, tanto para su diagnóstico como para su asesoramiento genético (250, 251). Andersen y colaboradores (252) realizaron un estudio en el que mostraban que los heterocigotos poseían una capacidad oxidativa máxima y un pico de lactato similares a los observados en controles en respuesta a ejercicios isométricos, sugiriendo que estos heterocigotos no eran propensos a desarrollar los síntomas de la enfermedad de McArdle. Los pacientes aquí estudiados eran sintomáticos y, en principio, “heterocigotos genéticos” por lo que probablemente su base genética era la de heterocigotos compuestos, en los cuales, la metodología del análisis genético del gen *PYGM* en ADN genómico fue incapaz de identificar una segunda mutación alélica con un componente obvio de patogenicidad.

Las mutaciones terminadoras, las mutaciones que alteran el marco de lectura y aquellas que afectan al correcto mecanismo “corte y empalme de exones”, suelen inducir la aparición de PTCs que a su vez pueden desestabilizar los ARN mensajeros (253, 254). Estos tipos de mutaciones predicen la síntesis de proteínas truncadas, que posiblemente no lleguen a ser sintetizadas o bien lo hagan en baja cantidad. Esto es debido al mecanismo de supervivencia del ARN denominado “Degradación mediada por proteínas terminadoras”, NMD (del inglés “*Nonsense mediated decay*”), que consiste en la eliminación de la mayoría de los transcritos que contienen PTCs (255, 256). Este mecanismo biológico protegería al organismo frente al efecto deletéreo de proteínas truncadas que tuvieran un efecto negativo dominante o de ganancia de función, además de ser un proceso crítico en el desarrollo celular (257). El mecanismo presenta una regla de actuación que se cumple en la mayor parte de los casos y que implica el no reconocimiento de aquellos PTCs situados en la región que comprende los últimos 50-55 nucleótidos del penúltimo exón y el último exón del gen (255, 258, 259). Aproximadamente una tercera parte de las enfermedades genéticas son debidas a la presencia de PTCs en ARN mensajeros que son degradados total o parcialmente mediante NMD (257, 260). Se han observado disminuciones en los niveles de mensajeros mutados con PTCs en diferentes enfermedades como cáncer de mama (261), enfermedad de Gaucher (262), o en trastornos debidos a mutaciones en el gen de la ADN polimerasa gamma (263). La degradación de estos mensajeros que portan PTCs podría relacionarse con el fenotipo clínico de los pacientes (257) en algunos casos.

Se han descrito algunas de las variaciones genéticas en el gen *PYGM* susceptibles de sufrir la acción del mecanismo de protección NMD. Este es el caso de la mutación más común en los pacientes con enfermedad de McArdle, p.R50X [con una incidencia del 50% en población caucásica (33, 80, 82, 194, 264)], cuya aparición del codón prematuro de terminación parecen provocar la actuación del NMD produciéndose la eliminación de los ARNs mensajeros que la portan (141). Otro caso es

del polimorfismo neutro (p.K609K) (140) cuyo cambio nucleotídico causa un error en el mecanismo de corte y empalme de forma que se producen una serie de mensajeros aberrantes susceptibles de sufrir la acción del NMD, modificando finalmente la expresión de la miofosforilasa.

Esto apunta a la posibilidad de que pacientes que llevan en uno de sus alelos mutaciones intrónicas o polimorfismos sin evidencias “*a priori*” de ser patogénicos, sean considerados, en un principio como “heterocigotos manifiestos”. Por ello, en estos supuestos se requiere el estudio de los transcritos. Por este motivo se estudiaron los ARNm de aquellos pacientes que cumplían los criterios anteriormente expuestos y de los cuales se disponía muestra de tejido muscular. Se extrajo el ARN total del músculo y, se amplificó, secuenció y analizó el ADNc del gen *PYGM* de cada uno de ellos. Siguiendo este protocolo, se identificó en el paciente 2 una segunda mutación consistente en una delección de 1.094 pb, c.(1969+214)_(2177+369)del, que abarcaba desde el intrón 16 hasta el 17, incluyendo el exón 17. Esta delección de aproximadamente 1.1 Kb, es probable que estuviera originada por la presencia de la repetición directa del hexanucleotido, “agacca”, que flanqueaba ambos extremos de la delección. Esta mutación probablemente no fue detectada en el análisis inicial del ADN genómico, debido a que los cebadores utilizados para la amplificación del exón 17 se encontraban localizados dentro de la zona delecionada, por tanto, uniéndose al alelo que no llevaba esta alteración, y por ello amplificándose y secuenciándose únicamente el fragmento correspondiente a la secuencia natural. Esta delección genética conduce a la desaparición del exón 17 en el ARNm (“*skipping*”), y por tanto, se dejarían de traducir unos 69 aminoácidos (81). Además, los niveles de expresión del ARNm estaban reducidos drásticamente en este paciente (únicamente se detectó un 3% de los transcritos respecto al control). Este hecho es compatible con la actuación en ambos alelos del mecanismo de NMD, ya que uno porta la mutación p.R50X, y el otro la delección del exón 17 que produciría la aparición de un PTC en el exón 18, siendo ambos mensajeros susceptibles a la degradación (figura 67).

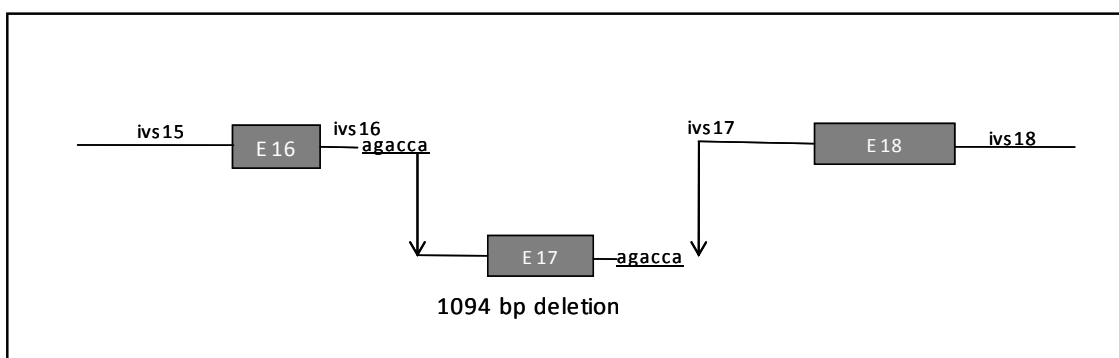


FIGURA 67. Esquema de la delección de 1094 pb en el gen *PYGM* en el paciente 2.

En el paciente 3 que portaba la mutación común p.R50X y un nuevo aparente polimorfismo heterocigoto, c.645G>A (p.K215K) localizado 16 nucleótidos antes del final del extremo 3' del exón 5, se observó sólo un 5% de expresión relativa de los transcritos *PYGM* respecto a controles por PCR a tiempo real; lo que sugiere que esta mutación podría alterar algún “sitio potenciador” de corte y empalme de exones, tal como se ha descrito en el caso de dos mutaciones del gen de la carbamil fosfato sintasa (265). Estos resultados apoyan la actuación del NMD sobre los mensajeros de procedentes de los dos alelos (p.R50X y p.K215K) eliminando los transcritos mutados.

Inicialmente no se dispuso de más muestra tisular para proseguir con un estudio experimental de las causas que disminuían niveles residuales del número de mensajeros, por ello se recurrió a un estudio bioinformático sobre la estabilidad teórica del ARNm utilizando el programa “mfold”. Este análisis predijo una estructura de la conformación del ARN debido a la mutación c.645G>A que difería respecto a la natural. Se encontró el nucleótido 645G localizado en la estructura secundaria del ARNm y que la mutación suponía una pérdida de estabilidad en esta estructura, siendo la energía libre de Gibbs más elevada para el plegamiento de la forma mutada que para la natural.

Aunque finalmente se consiguió amplificar el ADNc en este paciente, lo que mostró una molécula de tamaño normal que portaba el polimorfismo en aparente estado de homocigosis, estos resultados no parecían concordar con la posibilidad de que este polimorfismo pudiera estar afectando a procesos de “*splicing*” (266). Por otra parte, bajos niveles de expresión del alelo p.K215K podrían escapar a la actuación del NMD (141), y por tanto ser este mensajero portador de la variante sinónima p.K215K el que se observó al amplificar por PCR.

Posteriormente mediante un estudio *in silico* de la variante c.645G>A, mostró que esta sustitución podría eliminar una “secuencia supresora” del empalme exónico, ESS (del inglés “*Exonic Splice Silencer*”), lo que sugería que podría verse alterado el *splicing* en esta región.

Siguiendo con el estudio de patogenicidad de la mutación p.K215K se realizó la extracción, amplificación, secuenciación y, posterior, clonación del gen *PYGM* a partir de sangre periférica de un familiar directo del paciente 3. Esta amplificación “ilegítima” del gen *PYGM* permitió la caracterización de los mensajeros anómalos que portaban esta variante sinónima. Estos transcritos sufren una alteración en los procesos de corte y empalme, de tal manera que este cambio nucleotídico, provoca la retención de los intrones adyacentes, ivs 6 e ivs 7, lo que a su vez produce un desplazamiento del marco de lectura generando un PTC a 17 nucleótidos del extremo 5' del exón 6, por lo que estos transcritos sufrirían la actuación del NMD y serían degradados, lo que impediría su detección y posterior cuantificación (figura 68).

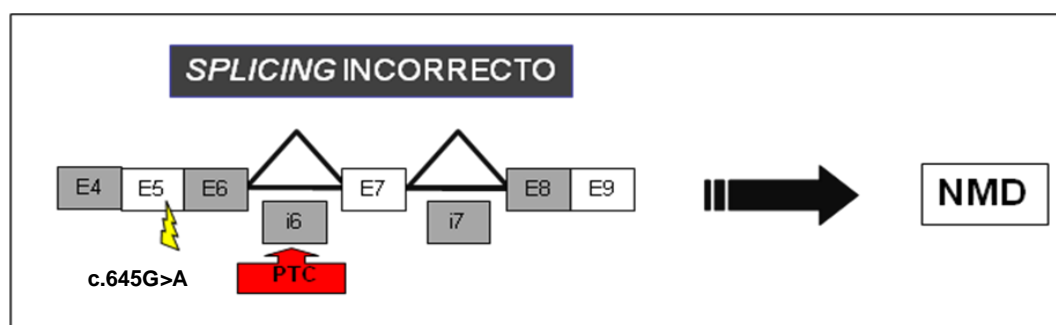


FIGURA 68. Mecanismo de *splicing* propuesto para la variante sinónima p.K215K. Como consecuencia de la alteración de la secuencia nucleotídica c.645G>A en el extremo 3' del exón 5, se produciría una anomalía en la maduración del ARNm mutado provocando un mal procesamiento que implicaría la retención de los intrones 6 y 7 en la secuencia del mensajero. Este hecho predice la aparición de un PTC lo que aumentaría la susceptibilidad de este transcrito a la actuación del mecanismo NMD.

Los pacientes 4 y 6, presentaban mutaciones que provocan un desplazamiento del marco de lectura con aparición de PTCs, p.R771PfsX33 y p.G136AfsX159, respectivamente, debido a la duplicación de dos citosinas en el primer caso, y la delección de una guanina en el segundo. Como consecuencia actuaría sobre estos transcritos el mecanismo NMD, eliminándolos, y por tanto, en principio en estos pacientes se degradaría el mensajero procedente del gen *PYGM* correspondiente a los alelos portadores de estas mutaciones. Sin embargo, la mutación p.R771WfsX33 parece eludir el mecanismo NMD, ya que en nivel relativo de los transcritos en el paciente 4 que era homocigoto para la mutación, fue del 40% respecto al valor control. Este hallazgo podría ser explicado debido a que el PTC originado por esta mutación se localiza en el último exón del gen *PYGM*, evitando así la regla NMD de los 50-55 nucleótidos indicada anteriormente (255, 258, 259, 267), por lo que cabría esperar la síntesis de una proteína truncada de 804 aminoácidos, 38 menos que la original, en la que se perdería parte del extremo carboxi-terminal, incluyendo los codones 824 y 825, los cuales están muy conservados en la secuencia aminoacídica de esta proteína en la escala filogenética (65). Por otro lado, se han descrito otras mutaciones generadoras de PTCs que afectan a regiones cercanas al codón 771 causantes de la enfermedad de McArdle tal como la p.E779delE, que se encontró en un paciente coreano (131), la p.C784X (33) y la p.E797VfsX18 (102), éstas dos últimas descritas en pacientes de origen español. Además debido a que este paciente mostró una ausencia total de actividad de la miofosforilasa, es consistente con que esta proteína no sería funcional.

La paciente 5 fue homocigota para la mutación p.M442K, un cambio de aminoácido neutro por uno básico que podría desestabilizar un sitio muy conservado que se encuentra cerca de varios residuos implicados en la unión de glucógeno (65), lo que daría lugar presumiblemente a una proteína no funcional.

Además esta mutación se consideró como patogénica basándose en los siguientes criterios: i) ausencia de la mutación en 200 alelos procedentes de controles sanos, descartándose así que fuera una variación polimórfica, ii) tras el análisis completo del gen *PYGM* de la paciente, fue la única alteración presente en estado homocigoto, iii) el estudio del grado de conservación filogenética muestra que el residuo de un aminoácido está muy conservado en la evolución.

Como ya se ha señalado la enfermedad de McArdle es una miopatía metabólica de herencia autosómica recesiva, producida por el déficit de miofosforilasa, codificada por el gen *PYGM*. La enfermedad se caracteriza por una marcada heterogeneidad molecular, habiéndose descrito hasta la fecha más de 130 mutaciones diferentes. El diagnóstico molecular completo es laborioso, dado que el gen consta de aproximadamente 14 Kb, y los estudios con ADN genómico, aunque consiguen genotipar a un porcentaje muy elevado de pacientes (33) no permiten caracterizar a nivel molecular de manera definitiva a un pequeño porcentaje de los mismos. A su vez, los estudios sobre ARN mensajero son necesarios para intentar averiguar el efecto que producen las mutaciones en el procesamiento del mismo, principalmente en el caso de la presencia de variantes sinónimas y de aquellas alteraciones que afectan al correcto corte y empalme del gen *PYGM* entre las que se incluyen tanto mutaciones intrónicas como aquellas variantes que puedan afectar al proceso de maduración de los mensajeros.

En el presente trabajo se ha confirmado la existencia de expresión de ARN mensajero del gen *PYGM* en células mononucleadas de sangre periférica, PBMC, tanto en la fracción CD14+ correspondiente a los monocitos, como en la CD14-, que incluye los linfocitos, por consiguiente la separación de ambas poblaciones se hace innecesaria en este tipo de análisis. Otros autores han destacado esta fase separativa como necesaria en el estudio de otras proteínas musculares como la disferlina, la cual únicamente se expresa en la fracción que comprende los monocitos (242, 268). El análisis de mutaciones a nivel de ARN mensajero ha sido aplicado recientemente a varias enfermedades genéticas, debido a que puede tener ventajas en cuanto a coste y rapidez en el contexto del diagnóstico molecular (269).

En este estudio se han presentado los resultados de un análisis retrospectivo del ARNm del gen *PYGM* presente en PBMC en dos pacientes con enfermedad de McArdle cuyas alteraciones genéticas ya habían sido identificadas previamente y estudiadas tanto a nivel genómico como en los transcritos del tejido natural de expresión de la miofosforilasa, es decir, en músculo esquelético adulto. Con este enfoque, se corroboró la patogenicidad de las mutaciones encontradas en dos pacientes. En el paciente 1, heterocigoto compuesto para mutación p.G205S y un cambio intrónico en el extremo 5' del intrón 4 que produce la retención de 6 nucleótidos, que a nivel proteico se traduciría con la inserción de 2 nuevos

aminoácidos en la secuencia, p.Q176_M177insVQ; y en el paciente 2, heterocigoto compuesto para la mutación p.R50X y la delección de 1094 pb, c.(1969+214)_(2177+369)del, que provocaba la aparición de un PTC.

Mediante los métodos habituales de cribado de ADN genómico para el gen *PYGM* este tipo de mutaciones terminadoras que alteran el marco de lectura y que afectan al correcto “corte y empalme de exones”, o no son detectadas o, si lo son, no pueden ser distinguidas de variaciones polimórficas. Una forma de probar el mecanismo molecular de patogenicidad de estas mutaciones sería mediante el uso como material de partida el ARNm procedente de músculo esquelético, pero debido a que estas alteraciones ocasionan la aparición de PTCs en los transcritos del gen *PYGM*, éstos son degradados por el mecanismo de protección NMD (141) en este tejido.

En este sentido, cuando dos mutaciones nulas están presentes los transcritos derivados de ambos alelos son degradados, aunque en ocasiones las condiciones de la reacción de amplificación por PCR pueden ser forzadas, aumentando la sensibilidad de la técnica hasta conseguir amplificar cantidades residuales de estos mensajeros portadores de PTCs. Por otro lado, en los casos que presentan una mutación nula en combinación con una mutación con cambio de aminoácido o mutaciones que no producen desplazamiento del marco de lectura, el alelo que contiene la mutación nula es degradado, de tal forma que cuando se secuencian los amplicones de PCR se detecta principalmente el alelo que porta el otro tipo de alteración, lo que se denomina, estado de “pseudohomocigosis”. Esta era la situación del paciente 2, cuyo estudio a nivel de los mensajeros procedentes de músculo mostraba la mutación c.(1969+214)_(2177+369)del en estado de “pseudohomocigosis”, al no detectar los transcritos portadores de la mutación nula p.R50X. Por el contrario, cuando el estudio se realizó en los mensajeros de este paciente aislados a partir de sangre periférica, se observó que ambos alelos estaban expresados apareciendo ambas mutaciones en heterocigosis. Estos resultados fueron confirmados en los dos hijos de este paciente cuyos mensajeros del gen *PYGM* obtenidos a partir de sangre periférica presentaron heterocigosis, uno la mutación nula p.R50X, y el otro la delección. Es destacable que esta delección de 1094 pb no habría sido detectada mediante el análisis convencional del gen *PYGM*, lo que sugiere que este método de identificación de mutaciones a nivel de ARNm en un tejido “ilegítimo” puede servir para llegar a un correcto diagnóstico molecular en pacientes con enfermedad de McARDle y de familiares portadores.

En relación a estos estudios de PCR ilegítima, se analizaron otros 4 casos. Tres pacientes que presentaban la mutación p.R50X en heterocigosis (pacientes 7 y 8), el hijo del paciente 7 con la mutación p.R50X en uno sólo de sus alelos, y el paciente 9 que era homocigoto para esta mutación.

Merece destacar que en todos ellos se pudo establecer que el mecanismo NMD en células de sangre periférica no parece actuar sobre los transcritos del gen *PYGM* que portan esta mutación nula. Estudios previos han descrito que la protección mediante NMD es tejido-específica en el sentido de que se encuentra activo únicamente en el tejido dónde se expresa la proteína sobre la que actúa (270-272). Es razonable pensar que estas diferencias son probablemente debidas a que la maquinaria NMD interacciona con los mensajeros durante el proceso de traducción y que como consecuencia estos transcritos del gen *PYGM* expresados “de forma ilegítima” en células sanguíneas no son traducidos. Este hecho se confirmó mediante inmunoblot de la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa a partir del extracto proteico total procedente de células de sangre periférica en el cual no se pudo detectar esta isoforma muscular ni en sujetos control ni en pacientes con mutaciones el gen *PYGM*.

Por otro lado el análisis de los niveles de los transcritos del gen *PYGM*, cuantificados en células sanguíneas por PCR a tiempo real puso de manifiesto que no existe una relación entre los niveles de mensajeros con diferente mutaciones en el gen *PYGM* en células sanguíneas y los niveles encontrados para estos ARNm mutados en músculo esquelético (131, 141), lo que indica que en sangre periférica los transcritos presentan una susceptibilidad diferente a la degradación. Estos hallazgos junto a aquellos obtenidos a partir de la secuenciación de los mensajeros procedentes de sangre periférica de los pacientes, apoyan la hipótesis de que debido a la falta de expresión de la proteína miofosforilasa en sangre sus ARN mensajeros no parecen estar sometidos a este tipo de regulación traduccional.

Aunque el mecanismo y el sentido biológico de la transcripción ilegítima no están aún totalmente aclarados, dado que los mensajeros ilegítimos portan las mismas alteraciones patológicas que los transcritos legítimos, este proceso patológico puede ser aprovechado como una herramienta muy útil en el estudio de ciertas enfermedades hereditarias. Esta estrategia podría ser aplicada ampliamente en enfermedades en las que las muestras de los tejidos diana son difíciles de obtener, o cuando el uso de ARNm es más fácil o más informativo que el del ADN, como por ejemplo cuando los genes son de gran tamaño y/o cuando se trata de mutaciones o variantes genéticas que alteran el corte y empalme en la maduración de los ARNm (273).

Aunque este trabajo pone de manifiesto la importancia del uso de ARN como molécula de estudio en los defectos causados por anomalías en su procesamiento en este tipo de patologías moleculares, hay que reseñar que los pacientes homocigotos para la mutación p.R50X, que sufre la actuación del NMD, muestran un fenotipo básicamente similar a pacientes con mutaciones de cambio de sentido y cuya expresión transcripcional es aparentemente normal.

Un examen detallado de las bases moleculares de la enfermedad es un primer paso importante para el desarrollo de enfoques terapéuticos racionales y eficaces (274). Entre estos se incluyen aquellos dirigidos a suprimir los PTCs farmacológicamente evitando así la actuación sobre estos transcritos del mecanismo NMD. Aminoglucósidos, como la gentamicina, son antibióticos en los que se han demostrado que interfieren en el mecanismo de traducción del ARNm en los ribosomas de forma que se ignora el codón prematuro de terminación, generándose una proteína de tamaño natural. Estos medicamentos se han propuesto con el fin de suprimir estos PTCs en varias enfermedades genéticas como fibrosis quística (FQ), distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), diabetes insípida nefrogénica ligada al cromosoma X, cistinosis, enfermedad del riñón poliquístico y atrofia espinal muscular recesiva (145). Sin embargo, los ensayos preliminares con aminoglucósidos no han tenido todo el éxito esperado (275). Se han obtenido resultados farmacológicos más prometedores utilizando una molécula recientemente desarrollado el PTC124 (276), que permite leer a los ribosomas por encima de las mutaciones sin sentido en el ARNm y continuar el proceso de traducción para sintetizar una proteína completa y funcional, de forma similar a los aminoglucósidos. De varios miles de compuestos químicos que han sido probados automáticamente por su habilidad para leer a través de los PTCs en el ARNm de la distrofina, cuyo defecto causa DMD, o de la proteína CFTR, proteína ausente en la fibrosis quística, se encontró que el PTC124 el más eficiente (277). En el estudio de la DMD, la distrofina aparece con un tamaño normal, 427 KDa, en cantidades casi normales en cultivos primarios y en hasta un 25% de las fibras musculares de ratones mdx (KO para el gen de la distrofina) a los que se les administró vía oral este fármaco (182). Además estudios de toxicidad con altas dosis del fármaco no mostraron efectos secundarios agudos o serios (278). También se han realizado estudios con este fármaco en el modelo de ratón FQ para la fibrosis quística (276, 279).

Parece que los enfermos con McArdle serían candidatos susceptibles para este tratamiento terapéutico debido a: i) la alta incidencia de actuación del mecanismo NMD, y ii) más del 50% de los pacientes presentan la mutación común p.R50X, al menos en uno de sus alelos.

En este sentido, se estudió la expresión de la proteína miofosforilasa en homogenados musculares procedentes de 17 pacientes con la enfermedad de McArdle, caracterizados tanto genética como bioquímicamente, los cuales mostraron todos ausencia total de actividad enzimática en tejido muscular. En este análisis mediante inmunoblot con un anticuerpo policlonal frente a esta proteína se observó la ausencia de una banda de 97 KDa correspondiente a la proteína miofosforilasa, independientemente del sexo, la edad o el genotipo *PYGM* que presentaban los pacientes. Estos hallazgos son consistentes con la ausencia de actividad fosforilasa observada en estos pacientes (136). El genotipo de estos 17 pacientes fue variado y

consistía en mutaciones nulas (p.R50X), mutaciones de cambio de aminoácido (p.W798R, p.G205S, p.R94W, p.A365V, p.A660D, p.G174D), variantes sinónimas (p.K215K, p.K609K, p.E383K) y mutaciones que provocan el desplazamiento del marco de lectura y, por tanto, un codón prematuro de terminación (p.R771WfsX33, p.K754fsX49 y p.L5VfsX22), y susceptibles de sufrir la eliminación de los transcritos por NMD y no llegar a traducirse los mensajeros que portan PTCs, salvo aquellos con la mutación p.R771WfsX33 que escaparía de la actuación del MND al aparecer el codón de parada en el último exón. Así, aunque en el paciente 4 (p.R771WfsX33) cabe esperar la aparición de una banda de menor peso molecular, de aproximadamente 92 KDa correspondiente al tamaño de la proteína truncada en 38 aminoácidos, no se identificaron niveles apreciables de proteína en este paciente. Asimismo, en los pacientes portadores de mutaciones con cambio de aminoácido, de los que se esperaba obtener una banda del tamaño normal de la miofosforilasa, aunque esta no fuera funcional debido a las mutaciones que portan, tampoco se observó ninguna banda mediante *western blot* de esta proteína.

La molécula PTC124 actúa durante la traducción a nivel del ARN, sobre aquellos transcritos que portan mutaciones terminadoras, sustituyendo estos tripletes terminadores por un triplete codificante de otro aminoácido, permitiendo a su vez al ribosoma continuar con la lectura del transcrito llegando a la síntesis de una proteína que en parte será funcional (182). Esto se ha observado, por ejemplo, en ensayos clínicos con pacientes con DMD en los cuales la ausencia de la proteína de distrofina es consecuencia de a este tipo de mutaciones, en los cuales, tras el tratamiento con el PTC124 han pasado a tener cantidades detectables de la proteína aunque esta no sea completamente funcional, siendo considerados enfermos con DMB, una forma distrofias musculares con mejor pronóstico (280).

Los hallazgos obtenidos de los estudios de procesamiento de ARNm y de los niveles de proteína muscular miofosforilasa en esta tesis indican que en aquellos pacientes portadores de mutaciones nulas o con desplazamiento del marco lectura que originan PTCs (que representan aproximadamente un 35% de todas las alteraciones descritas (141) en el gen *PYGM*), podrían beneficiarse del mecanismo de acción por el cual ocurre un salto del codón prematuro de terminación mediante el empleo de PTC124. Sin embargo, dado que independientemente de la mutación presente en los pacientes parece que la proteína miofosforilasa no está presente, es posible que estos mensajeros no se llegaran a traducirse. Sin embargo, aún cabría la posibilidad de que el triplete codificante introducido por PTC124 no estuviera sometido a este efecto negativo sobre la expresión de miofosforilasa en músculo esquelético.

Con el objeto de profundizar en los mecanismos de transcripción y traducción de la miofosforilasa, y debido a la ausencia de proteína en todos los 17 casos

estudiados en este trabajo, se estudio la actividad traduccional de los transcritos del gen *PYGM* en un control sano y en el paciente 4 (homocigoto para p.R771WfsX33), cuyos transcritos escapan al mecanismo de protección NMD. Este análisis se realizó en cultivos primarios de mioblastos diferenciados a miocitos-miotúbulos del paciente y de un control, pareados por edad y sexo. Los polisomas son estructuras originadas durante la traducción activa de un mensajero debido a la presencia de más de un ribosoma asociado a él. De forma convencional, la presencia de polirribosomas en un extracto celular puede observarse mediante centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa (281). Los ribosomas de eucariotas son de 80 S, formados por una subunidad grande de 60 S y una pequeña de 40 S (282). Se puede considerar que los mensajeros asociados a estas estructuras, 80S, están siendo traducidos activamente por la célula. El número de ribosomas asociados a un mensajero al mismo tiempo depende de parámetros como la longitud del propio mensajero y la velocidad con la que los ribosomas inician, elongan y terminan la traducción (283). La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas. Actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional. De esta manera, se obtuvo la fracción correspondiente a los polisomas y se extrajo el ARNm asociado a los mismos.

Los resultados obtenidos mediante esta aproximación metodológica mostraron una traducción activa de los transcritos del gen *PYGM* tanto en el paciente como en el control. Este hecho sugiere que la ausencia de la proteína en los pacientes no se debe a una inestabilidad de los mensajeros que portan las diferentes mutaciones, sino a un proceso post-traduccional, es decir, es la propia inestabilidad de la miofosforilasa mutada producida por la lectura de los diferentes transcritos alterados la que produce la degradación inmediata de la misma. Por lo tanto, aunque la molécula PTC124 intercambiara el codón prematuro de terminación del mensajero portador por otro codon traducible y, de esta manera, evitara la acción del NMD sobre este transcrito, produciéndose la traducción del mismo, la proteína sería degradada nada más ser sintetizada al diferir de la secuencia natural de la glucógeno fosforilasa muscular al igual que ocurre con los transcritos portadores de mutaciones “*missense*” en los pacientes con la enfermedad de McArdle. Sin embargo, este razonamiento ha de ser demostrado experimentalmente ya que el triplete traducible podría escapar a esta presión selectiva, al igual que ocurre con las excepciones conocidas de las reglas del NMD.

Además, siguiendo este argumento, es razonable pensar que otras terapias dirigidas sobre los ARNs, como la estrategia de “*exón-skipping*” no tendrían ningún efecto sobre los pacientes con enfermedad de McArdle, ya que este proceso consiste en la conversión de una mutación con cambio en la pauta de lectura (“*out-of-frame*”), en una mutación sin desplazamiento del mismo (“*in-frame*”) que permita continuar con la transcripción correcta, tras la eliminación en el ARNm de uno o más exones

localizados antes o después del exón pero que incluyan la mutación puntual que provoca la eliminación del transcrito portador (284, 285).

Tampoco es esperable en corto-medio plazo la disponibilidad de terapia génica efectiva para reemplazar la glucógeno fosforilasa muscular (286). Por esto, se hace necesario un conocimiento más profundo de la expresión y regulación de las diferentes isoformas de la glucógeno fosforilasa, como la cerebral y la hepática, ya que podrían contribuir al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para la enfermedad e McArdle. En este sentido, la actividad GP podría ser restablecida en el músculo esquelético con la re-expresión de los genes que codifican para las otras isoformas, *PYGB* y *PYGL*. Esta estrategia se ha probado en músculos distróficos de ratones mdx, “sobre-regulando” la expresión de utrofina, una proteína con estructura y función similar a la distrofina, de manera que se ha incrementado la producción de utrofina de 3 a 4 veces, reemplazando a la distrofina y previniendo los síntomas de la distrofia muscular (287, 288). También en esta línea de trabajo, en la distrofia muscular de cinturas tipo 2D, se utiliza ϵ -sarcoglicano con el objeto de compensar la ausencia de α -sarcoglicano (289). Las diferentes isoformas de la glucógeno fosforilasa se expresan en distintos tejidos de forma natural, con lo que cabría esperar la ausencia de cualquier tipo de rechazo ya que no habría respuesta inmunológica en este tipo de terapias de “sobre-regulación”. Podría surgir algún tipo de problema relacionado con las funciones reguladoras de las diferentes isoformas, ya que el cometido principal de la glucógeno fosforilasa hepática consiste en mantener la homeostasis de la glucosa, y que la activación de la isoforma cerebral sólo ocurre en situación de anoxia cerebral y de baja disponibilidad cerebral de glucosa; sin embargo, la función principal de la miofosforilasa es proveer a las fibras musculares de glucosa rápidamente cuando estás la demandan.

En su conjunto estos resultados llevan a pensar que aún quedan muchos aspectos no bien conocidos sobre esta proteína, en la cual una “*a priori*” leve alteración en el código genético en su gen *PYGM* conllevaría a la eliminación o a la falta de síntesis de la misma. Este fuerte control de calidad a la que se ve sometida la GP muscular podría indicar que esta proteína tuviera otras funciones ahora desconocidas, de forma que la síntesis de una proteína anómala condujera a una alteración de algún proceso celular importante.

Sería muy relevante disponer de un modelo celular en el que se pudieran realizar estudios a gran escala tanto de sobre-regulación de estos genes como de otros genes que expresen proteínas musculares con diferentes funciones (estructural, metabólica, etc), para intentar averiguar si existe alguna asociación directa o indirecta con la miofosforilasa. En este sentido, el estudio de los cultivos de células musculares de controles y pacientes de McArdle revela que los niveles de ARNm del gen *PYGM* en estos mioblastos son insignificantes sin tener en cuenta la etapa de diferenciación,

aunque después de 12 días parece que existe un aumento, aunque no se ha conseguido observar la isoforma GP muscular mediante inmunoblot, sí que se ha descrito una reducción de la actividad GP total en estos cultivos (248). Se necesitan más estudios en este tipo de cultivos para aclarar los mecanismos de adaptación metabólica que los mioblastos sufren en condiciones *in vitro*. De esta manera, se podrían ensayar también inhibidores de las proteasas como la leupeptina, para impedir la degradación de la miofosforilasa en los pacientes de McArdle, y obtener información sobre las enzimas/proteínas que actúan sobre la misma.

Se ha descrito que la miofosforilasa es sustrato natural de la isoforma muscular de la calpaína, calpaina-3 (290); en ese trabajo los autores indican que la glucógeno fosforilasa interacciona con calpaina-3, que a su vez es posible que regule tanto la degradación como la actividad de la miofosforilasa. Sería interesante realizar un estudio de esta proteína en enfermos de McArdle ya que según un trabajo reciente los transcritos de la calpaina-3 se encuentran alterados en pacientes con glucogenosis tipo V (datos sin publicar). En este estudio se cuantificó la expresión de los transcritos de genes pertenecientes a vías metabólicas (metabolismo del glucógeno, metabolismo de ácidos grasos, metabolismo de los aminoácidos, metabolismo de los cuerpos cetónicos, metabolismo de la fosfocreatina), diferentes tipos de transportadores (transportadores de glucosa, transportadores mitocondriales de ácidos grasos, transportadores de calcio del retículo sarcoplasmático), factores de transcripción, genes de función mitocondrial (codificados por el ADN mitocondrial, cadena de transporte electrónico de codificación nuclear, defensa antioxidante, dinamismo mitocondrial), genes estructurales (organización de la estructura del sarcómero, adhesión, crecimiento, diferenciación, regeneración y receptores del impulso nervioso), genes relacionados con procesos de inflamación, estrés celular y apoptosis. Se identificaron 6 genes que estaban infraexpresados de forma significativa en los pacientes con enfermedad de McArdle. Entre los genes diferencialmente expresados se encontró *GYS1*, que tiene una estrecha relación con la deficiencia en la actividad GP muscular, debido a su importante papel metabólico. Por otro lado, también se encontraron diferencias en la expresión de los genes *ACACB*, *CK*, *CAPN3*, *ATP2A1* y *CADH15*.

El gen *GYS1* se expresa de forma generalizada en el organismo. *GYS1* codifica la proteína glucógeno sintasa muscular que se encarga de añadir monómeros de glucosa a la molécula creciente de glucógeno. Mutaciones en este gen dan lugar a la glucogenosis tipo 0 (291). El hallazgo de unos niveles bajos de transcritos *GYS1* en los pacientes con enfermedad de McArdle se correlacionaría con la baja actividad glucógeno sintasa que fue encontrada en dos series de pacientes con McArdle en trabajos previamente publicados (243, 292). En ambos estudios se atribuyó esta actividad disminuida a la inhibición que producen los acúmulos de glucógeno sobre la actividad glucógeno sintasa.

La despolarización del sarcolema induce la salida de calcio del retículo sarcoplasmático hacia el citosol causando la contracción muscular. Después de la excitación de la musculatura las bombas ATP dependientes, entre las que se encuentra la ATPasa de calcio 1 del retículo sarcoplasmático (SERCA1), disminuyen la concentración de calcio citoplasmático bombeándolo hacia el lumen y los espacios extracelulares. SERCA1 se encuentra localizada en las fibras del músculo esquelético de contracción rápida. Mutaciones en el gen *ATP2A1* que codifica para la proteína SERCA1, causan la enfermedad de Brody, que se caracteriza por la imposibilidad de conseguir relajación muscular, y la presencia de rigidez y rampas, tras la realización de ejercicio (293). En los pacientes con enfermedad de McArdle unos niveles de transcritos *ATP2A1* reducidos podrían estar indicando anomalías en la homeostasis del calcio, lo que podría estar en consonancia con los episodios de rampas y la rigidez muscular que presentan estos pacientes tras ejercicio físico.

Esos resultados parecen sugerir la existencia de alteraciones transcriptómicas importantes en estos pacientes, pues prácticamente todos los ARNm diferencialmente expresados producen proteínas que poseen más de una función en el músculo esquelético, como la creatina quinasa muscular y la acetil-CoA carboxilasa beta implicadas en su metabolismo y estructura, o la caderina 15 que está asociada a estructura y regeneración muscular. En algunas ocasiones, niveles reducidos de transcrito minimizarían los síntomas debidos al bloqueo glucogenolítico, es decir, bajos niveles de mensajero de *GYS1* indicaría un menor síntesis de glucógeno, o menor expresión de *ACACB* indicaría un mayor catabolismo lipídico. Por el contrario, una menor expresión de *CKM*, *CAPN3*, *ATP2A1* y *CADH15* podría causar deficiencias a la hora de obtener ATP, a nivel estructural en el sarcómero, en el mantenimiento de los niveles de calcio durante la contracción muscular, y en el mantenimiento de la arquitectura y de la renovación de las fibras musculares. Además, estos resultados sugieren la presencia de alteraciones en los niveles de transcritos en los dos tipos de fibras mayoritarios en el músculo, ya que *ATP2A1* es específica de fibras tipo II y *ACACB* tiene una función predominante importante en las fibras tipo I. También se ha demostrado en algunos estudios (290, 294) la interacción entre algunas de estas proteínas, como la ATPasa de calcio 1 del retículo sarcoplasmático con la creatina quinasa muscular, y calpaína-3 con creatina quinasa muscular y con la ATPasa de calcio 1 del retículo sarcoplasmático, lo que sugiere la existencia de algún mecanismo regulador del ARNm derivado de estas interacciones.

La disminución de estos transcritos no implica una reducción en la expresión génica de los mismos ya que este término abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura ha sido sintetizada, de tal manera que dicha proteína contribuye a la expresión del fenotipo celular. La cuantificación de los niveles de ARNm que codifican para una proteína puede no ser un buen modelo para comprobar la expresión de dicha proteína en un tejido ya que en algunos casos no existe una

relación directa entre los niveles de ARNm y de proteína (295). La forma más común de detección proteica se realiza mediante inmunodetección utilizando anticuerpos comerciales. Como la cantidad de muestra necesaria para los estudios de proteínas es mayor que para los estudios de ARN, hemos seleccionado las proteínas cuyas alteraciones a nivel de transcritos se encontraron significativamente reducidas para estudiarlas más a fondo, SERCA1 y GS, debido a su papel clave en la función muscular. El músculo esquelético es el principal almacén de glucógeno, ya que la captación del glucosa se ve estimulada por la insulina y la mayor parte de esta glucosa se deposita en forma de glucógeno a través de la actividad de GS (296). La desregulación de esta vía ha sido descrita en pacientes de McArdle, en los cuales se ha visto una disminución en la acción de la insulina en el músculo esquelético, lo que resulta en un uso de la glucosa más bajo y un menor incremento en la actividad de GS (292). Los resultados del inmunoblot (ver figura 58) mostraron varias bandas que podrían representar diferentes modificaciones post-traduccionales como diferentes formas fosforiladas de la enzima. La GS posee 9 residuos susceptibles de ser fosforilados, lo que conlleva la inactivación progresiva de la enzima (296).

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas de proteínas altamente complejas. La base de su elevado poder de resolución se basa en que las proteínas son separadas secuencialmente por dos criterios físicos. En primer lugar las proteínas son separadas en un gel con gradiente de pH en condiciones desnaturizantes de acuerdo con su punto isoelectrónico (pI), es el isoelectroenfoque. Tras esta separación por carga las proteínas son separadas de acuerdo con su masa molecular por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). De esta manera se obtuvieron los mapas bidimensionales de las proteínas de músculo esquelético control y se compararon con los obtenidos en pacientes con la enfermedad de McArdle. Como era de esperar, el mapa correspondiente a los pacientes mostró una ausencia total de una serie de puntos que coincidían con el pI teórico de la GP muscular y su peso molecular, Sin embargo, en el control, en el que podríamos esperar observar sólo dos isoformas correspondientes a dos modificaciones post-traduccionales en la GP muscular en un gel 2D, uno en representación de la forma inactiva, no fosforilada y otro de la forma activa fosforilada en la serina 14 (244), se identificaron entre cinco o seis puntos para la glucógeno fosforilasa en tándem lo que sugiere que las modificaciones post-traduccionales, y posiblemente la regulación para esta proteína es más compleja de lo que previamente se ha descrito. La utilización de modelos de predicción de la fosforilación de proteína (Phosphosite, www.phosphosite.org), permitió conocer los valores de pI teóricos de la GP muscular según el número de fosforilaciones, ya que esta proteína posee 9 residuos de aminoácidos potencialmente fosforilables (figura 69).



FIGURA 69. Resultados teóricos obtenidos mediante el programa phosphosite (<http://www.phosphosite.org/staticContact.do>) para el análisis de la glucógeno fosforilasa muscular.

Un hecho a destacar es que se podrían comprobar estos resultados de forma experimental, mediante la digestión triptica de esta enzima y el posterior análisis de los péptidos producto en una trampa iónica. Es una de las técnicas actuales más utilizada en análisis de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (297).

Por ello, se combinó la alta resolución de la electroforesis bidimensional con la especificidad de la detección por anticuerpos para SERCA1 y GS, para obtener la expresión de estas proteínas en mapas bidimensionales en pacientes con la enfermedad de McArdle. Este análisis reveló unos niveles significativamente menores de la forma más ácida de glucógeno sintasa lo que podría corresponder a la isoforma fosforilada (inactiva). Este hecho, podría explicar al menos parcialmente por qué los pacientes con déficit de GP muscular aunque presentan acúmulos subsarcolemas de glucógeno no lo hacen en una cantidad mucho mayor como correspondería a un déficit total de la enzima que se encarga de su degradación. Kolberg y cols., describieron en 2007 una mutación nula en homocigosis, p.R462X, en *GYS1* (291) que se asocia con una disminución de la actividad de la enzima. Tras inmunodetección con el anticuerpo específico de la isoforma muscular de la glucógeno sintasa no obtuvieron señal de 84 KDa correspondiente al peso molecular de esta proteína. Entre los síntomas descritos por esta deficiencia se encontraba la alta fatigabilidad tras el ejercicio en el paciente, qué por otra parte, no presentó calambres ni mialgias. A pesar de que no existían diferencias en la expresión total de GS y SERCA1 por *immunoblot*, la actividad de estas enzimas puede variar sin ningún cambio en los niveles totales de su expresión dado que ambas proteínas se rigen por fosforilación reversible.

La reducida capacidad al ejercicio físico apoya la opinión general de que la regulación recíproca entre la glucogénesis y la glucogenolisis es crítica para la oferta de

energía durante el ejercicio. Esta regulación estaría afectada de alguna forma en los pacientes con enfermedad de McArdle, los cuales no sólo carecen de glucógeno fosforilasa muscular sino que la GS que contienen sus fibras musculares se encuentra en la conformación menos activa. Teniendo en cuenta estos resultados, se atribuiría la baja actividad de la GS no a los acúmulos de glucógeno, como se describe en trabajos previos (243, 292), sino a una probable desregulación en el control de la fosforilación como consecuencia de la falta de de miofosforilasa.

Se obtuvieron resultados semejantes en el *immunoblot* bidimensional de SERCA1. Esta enzima dependiente de magnesio cataliza la hidrólisis de ATP junto con la translocación de calcio del citosol al lumen del retículo sarcoplásmico, contribuyendo de esta manera, a la retención de calcio involucrado en la excitabilidad y la contracción muscular. En los pacientes con enfermedad de McArdle analizados se observaron grandes diferencias en el patrón bidimensional de distribución de las manchas de los *western blot* respecto a los controles, apareciendo una mancha (“spot”) hacia localizaciones de puntos isoeléctricos más básicos que apenas fue cuantificable. En las isoenzimas SERCA se producen grandes cambios conformacionales durante el proceso de transporte de los iones Ca^{2+} . En la primera etapa del ciclo catalítico de la enzima (figura 70), dos iones Ca^{2+} se unen al dominio M en su conformación de alta afinidad por Ca^{2+} (E1); casi de inmediato el ATP se une al residuo de lisina (Lys515), localizado en el dominio N. La enzima sufre un cambio conformacional que favorece el acercamiento del ATP, del dominio N al dominio P, para fosforilar un residuo de aspártico, lo que genera un intermediario fosforilado (E1P) (298-300). Nuestros resultados sugieren que la forma fosforilada de SERCA1 se encuentra aumentada, es decir, el intermediario fosforilado unido a Ca^{2+} , mientras que en los controles se mantenía un equilibrio entre ambos estados.

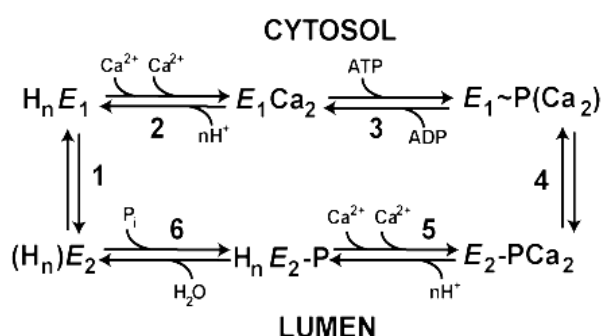


FIGURA 70: Ciclo catalítico de SERCA1 (301): la enzima se activa por la unión de dos iones de Ca^{2+} en los sitios de transporte (E2 a E1Ca2, pasos 1-2) y luego se fosforila en Asp351 para formar la fosfoenzima ADP-sensible (E1P, paso 3), que puede reaccionar con ADP para regenerar ATP. Tras la formación de este EP, los iones Ca^{2+} se introducen en los sitios de transporte (E1PCa2). La transición isomérica posterior da lugar a un cambio en la orientación de los sitios de unión de Ca^{2+} y la reducción de su afinidad, por lo que se produce la liberación de Ca^{2+} hacia la luz (4 y 5). Por último, la hidrólisis se lleva a cabo y devuelve la enzima en una forma no fosforilada y Ca^{2+} -independiente (E2, paso 6).

En músculo envejecido (302) se ha propuesto que SERCA1, una proteína de vida media larga, podría tener comprometida su estabilidad conformacional que a su vez estaría facilitando modificaciones post-traduccionales. Asimismo, las alteraciones debidas a cambios en la regulación dependiente de la fosforilación estarían contribuyendo al desacoplamiento del transporte de Ca^{2+} y a la disminución en la respuesta de las células musculares. En este sentido, un mecanismo similar podría estar ocurriendo en los pacientes con déficit de miofosforilasa.

La enfermedad de Brody (OMIN #601003) es una rara miopatía de herencia autosómico recesiva (AR), caracterizada por un creciente deterioro de la relajación muscular durante el ejercicio debido a la marcada reducción de la captación de Ca^{2+} por el retículo. La principal característica clínica de esta rigidez progresiva de los músculos ejercitados es dolor o calambres que afectan fundamentalmente a piernas y brazos (293, 303). A diferencia de los pacientes con la enfermedad de Brody, en los cuales existe una marcada disminución de la cantidad de SERCA1 presente en músculo esquelético, los pacientes con McArdle tienen niveles similares a los controles, pero parece que no existe una regulación entre el intermedio que capta el Ca^{2+} libre en el sarcoplasma y el intermedio que lo libera al lumen del retículo sarcoplásmico; en consecuencia no se mantiene esta regulación de calcio de forma correcta. Si unimos este hecho a la interacción descrita (304) entre el canal de rianodina (RyR) y la forma activa de la miofosforilasa para regular la salida de Ca^{2+} al sarcoplasma, se puede intuir que podría existir una concentración de Ca^{2+} anómala tanto dentro como fuera del retículo sarcoplásmico en los pacientes con McArdle. De esta manera los calambres que ocurren en estos pacientes podrían estar producidos por una contracción sostenida originada por estos elevados niveles intracelulares de calcio en la fibra muscular, los cuales SERCA1 no es capaz de reducir.

Las bases bioquímicas de la fatiga muscular en la enfermedad de McArdle aún no se entienden completamente y una reducción de la actividad de la ATPasa de sodio-fosfato se ha sido descrita como una posible causa (305). SERCA1 también puede participar en la fatiga temprana que los pacientes con la enfermedad de McArdle experimentan durante el ejercicio. Una disminución en la tasa de captación de calcio por el RS podría ser la responsable de la disminución en la relajación, e indirectamente responsable de la disminución de la fuerza durante la fatiga, como se ha demostrado en músculos fatigados (306). La reducción en estas dos ATPasas también podría estar relacionada, ya que la fuente de energía preferencial es glucogenolítica y se ha propuesto la localización cercana en la membrana de las enzimas glucolíticas y estos canales (307). A pesar de que SERCA1 parece no estar presente en los complejos musculares de la GP estudiados en este trabajo mediante la técnica de 2D-BN-PAGE-SDS, algunos estudios han aportado pruebas de que se encuentran en las proximidades. Meyer y colaboradores (308) encontraron partículas de glucógeno y

enzimas relacionadas con su metabolismo en complejos de glucógeno-proteínas aislados, entre ellas, la glucógeno fosforilasa en la fracción ligera, y elementos del RS caracterizados por una fuerte actividad ATPasa de la fracción pesada. Otros autores han reportado la presencia del RS en la banda I del sarcómero, donde se localizan los depósitos de glucógeno, y donde el glucógeno se reduce notablemente durante la actividad muscular (307-309). La interacción de la miofosforilasa con el glucógeno muscular y el retículo endoplasmático ha sido descrita por otros muchos autores (310-312), pero fue el grupo de Cuenda (313) el que describió en un estudio *in vitro* que la adición exógena de GP a vesículas aisladas del retículo sarcoplasmático favorecían la unión de ATP a SERCA1, sugiriendo así, la asociación de ambas enzimas.

Mediante la técnica del BN-PAGE se encontró que la GP muscular forma dos complejos en los que la GS también está presente. Esto es relevante ya que algunas alteraciones en la actividad de la GS y la fosforilación que ocurren en los pacientes de McArdle no puede ser completamente explicadas por la disminución de la actividad de las enzimas responsables de su modificación covalente (243). Los otros dos mecanismos de control involucrados son los reguladores alostéricos y la translocación enzimática, (314), pero esto no explica la baja tasa de fosforilación de GS muscular en estos pacientes. La presencia en el músculo de complejos GP-GS común sugieren que sus reguladores alostéricos, y modificadores covalentes funcionan mejor si las dos proteínas están físicamente unidas. Por ejemplo, como resultado de la contracción muscular se liberan las reservas del calcio del retículo sarcoplasmático (RS), lo que a su vez, activa la fosforilasa quinasa, activando a la GP e inactivando la GS, ambas por fosforilación. Los complejos de proteínas que contienen estas dos enzimas permitirían un acoplamiento más flexible, eficiente y rápido (315) entre la síntesis y la degradación del glucógeno. Además, la presencia de GP en el complejo parece estimular GS vinculante, como lo demuestra el hecho de que los pacientes McArdle presenten una GS un 30% menor en comparación con los controles sanos. En esta línea, el aumento de la forma más compleja de la glucógeno sintasa en detrimento de los complejos de menor peso molecular que se muestra mediante esta técnica en los pacientes con la enfermedad de McArdle, podría deberse a una ruptura del equilibrio dinámico entre las diferentes asociaciones de la glucógeno sintasa debido al déficit de miofosforilasa. Esta ruptura podría deberse a un problema de estabilidad y no de ensamblaje ya que, según nuestros resultados, parece que la forma compleja sea la más estable.

Estos resultados sugieren que la ausencia de GPM en pacientes con la enfermedad de McArdle puede dar lugar a una desregulación de puntos clave en el control del metabolismo del músculo esquelético. (i) una disminución de los niveles de proteínas y la fosforilación SERCA1 y (ii) una reducción en la cantidad de GS y un cambio hacia su forma inactiva, como protección de sobrecarga de glucógeno en el músculo. En general, este estudio muestra la existencia de un vínculo entre el músculo

GP, la contracción muscular y la síntesis de glucógeno que puede tener un papel principal en los eventos patofisiológicos de este trastorno.

La variabilidad entre los pacientes tanto en la frecuencia como en la severidad como en la edad de inicio de los síntomas, ya han sido descritos (100, 116). A lo largo del tiempo se han estudiado diversos factores que pudieran explicar esta heterogeneidad clínica. Entre ellos se ha valorado la posible influencia del genotipo y la gravedad de la expresión fenotípica de la enfermedad de McArdle, fundamentalmente considerando la mutación p.R50X (193). Pero esta variabilidad en el fenotipo no puede atribuirse a las diferencias en el genotipo de los pacientes. Todas las mutaciones hasta la fecha descritas resultan en la pérdida completa de la actividad enzimática y, nunca ha sido posible encontrar una correlación entre el fenotipo y el genotipo (82, 111, 286). De hecho, se han descrito familias con genotipos idénticos que cursan con manifestaciones clínicas diferentes (185, 316). Este hecho admite la complejidad de los trastornos mendelianos aparentemente sencillos en las denominadas enfermedades “monogénicas”.

Las modificaciones de proteínas inducidas por una enfermedad afectan sustancialmente a la función, lo cual, a su vez puede afectar a otras proteínas. Se produce un proceso dinámico de la expresión y modificaciones de las proteínas que es el que trata de identificar y caracterizar la proteómica. El avance en el conocimiento de la genómica y la proteómica ha llevado a considerar el planteamiento “un gen-una proteína-una enfermedad” una simplificación que ha quedado obsoleta. De hecho, normalmente las enfermedades no producen alteraciones de una única proteína, sino de muchas proteínas celulares y, especialmente, los procesos agudos producen variaciones de las modificaciones de las proteínas posteriores a la traducción. Los procesos crónicos, además de estas alteraciones de las modificaciones de las proteínas posteriores a la traducción, producen también cambios de la expresión de genes y, como consecuencia, variaciones de las concentraciones de proteínas celulares. Por este motivo, sería de gran utilidad el estudio del proteoma en el músculo esquelético adulto de enfermos de McArdle, ya que en este trabajo únicamente se ha estudiado las alteraciones causadas en la SERCA1 y en la GS debido a la ausencia de GP muscular. Los estudios de proteómica irían dirigidos a localizar las demás proteínas responsables de la heterogeneidad clínica, secuenciarlas, analizar sus cambios moleculares y descubrir la implicación de los mismos en los distintos fenotipos de los enfermos, ayudando a un entendimiento más profundo y global de esta patogénesis. Esta información no puede obtenerse del genoma ni del transcrito (conjunto de ARN mensajeros) como se ha visto en estudios anteriores (80, 120, 136), por lo que el estudio de los proteomas es imprescindible y complementario a los datos genómicos. Como hemos señalado en este trabajo, la identificación y caracterización de modificaciones post-traduccionales en proteínas es un campo que se escapa a la

información genética propiamente dicha por lo que la evaluación de la aproximación proteómica a esta área tiene una gran relevancia.

La estrategia clásica proteómica de identificación masiva de proteínas se ha aplicado extensivamente para la detección de proteínas asociada a tumores: cáncer de colon, hepatocarcinomas (317), fibrosarcoma (318), cáncer de vejiga (319, 320), cáncer de mama (321, 322), cáncer de pulmón (323), cáncer de riñón (324), cáncer de ovario (325), próstata, médula ósea (326). Más recientemente se ha comenzado su aplicación a distintos y variados problemas biológicos, como son: a) el estudio de determinantes de patogenicidad y resistencia a antibióticos en microorganismos; b) desordenes y degeneración del sistema nervioso; c) patologías humanas órgano-específicas, entre otras.

La proteómica clínica es un área a desarrollar y estudiar en esta patología, mediante el análisis comparado de los patrones de expresión proteica de controles *versus* pacientes con la enfermedad de McArdle, analizando de una forma exhaustiva y simultánea, cambios en un gran número de proteínas en el contexto de esta enfermedad. Pero a pesar de todo su potencial, los estudios han de ser cuidadosamente seleccionadas a fin de diferenciar niveles de expresión de proteínas como diferencias clínicas auténticas de aquellas derivadas de la recolección-manipulación de la muestra, variaciones derivadas de las condiciones experimentales y aquellas propias de una variabilidad biológica normal (327). De acuerdo con esto, los estudios de expresión diferencial de los enfermos de McArdle deberían realizarse de acuerdo a la clasificación fenotípica de los pacientes con esta patología descrita por el grupo del Dr. Martinuzzi (193), en la que se agrupan en cuatro niveles en función de la gravedad creciente del fenotipo clínico (tabla XVII), aunque algunos autores (199) destacan que esta clasificación no utiliza variables cuantitativas para establecer los niveles de afectación clínica, y que se fundamenta en una escala cualitativa que diferencia entre los diferentes grados en base a manifestaciones clínicas que en algún caso pueden llevar a confusión. Por ejemplo, un paciente casi asintomático con un episodio de mioglobulinuria se incluiría en la categoría 2 de la escala de gravedad clínica, que implica un alto grado de afectación clínica cuando realmente no es esto lo que ocurre.

Grado 0	Pacientes casi asintomáticos, que presentan como único síntoma relevante la fatiga
Grado 1	Pacientes sintomáticos, con dolor, contracturas y/o calambres
Grado 2	Pacientes que han presentado mioglobulinuria
Grado 3	Pacientes con debilidad fija o atrofia muscular proximal en cinturas y/o pelviana

TABLA XVII. Escala de gravedad clínica de los pacientes con la enfermedad de McArdle (193).

La sintomatología va muy ligada al tipo, intensidad y duración del ejercicio que la provoque, es decir vendrá en gran medida determinada por el estilo de vida de los pacientes, así como por los requerimientos físicos de su actividad laboral, la práctica habitual de ejercicio físico, la dieta, etc. Se puede deducir que el desarrollo de una escala de gravedad clínica basada principalmente en criterios cuantitativos permitiría posiblemente mejorar la precisión y la objetividad en los estudios proteómicos de expresión diferencial de los mapas proteicos en la enfermedad de McArdle. Para establecer variables cuantitativas que sirvan para caracterizar funcionalmente a los pacientes podrían utilizarse pruebas fisiológicas validadas del ejercicio físico (199, 328).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las siguientes conclusiones confirman y aportan consistencia a hallazgos previamente descritos de epidemiología molecular y relación genotipo-fenotipo en la enfermedad de McArdle:
 - 1.1. La mutación p.R50X es la más frecuente en población española, encontrándose en el 71% de los pacientes. Otras mutaciones con relativa frecuencia son la mutación privada p.G205S que aparece en el 17% de los pacientes, y la mutación p.W798R hallada en el 9% de los mismos.
 - 1.2. No se ha observado ningún tipo de relación entre la mutación p.R50X y la gravedad clínica, por lo que deben existir otros factores que expliquen la variabilidad clínica de los pacientes con enfermedad de McArdle.
 - 1.3. Se han logrado identificar 6 nuevas mutaciones en el grupo de 42 pacientes estudiados, aumentando el amplio espectro mutacional de la enfermedad.
2. Las alteraciones encontradas en procesamiento del ARN al estudiar los transcritos del gen *PYGM* sugieren qué son relevantes en esta patología. Se ha observado que la caracterización molecular de los mensajeros es una herramienta útil para el diagnóstico genético de los pacientes con la enfermedad de McArdle denominados “heterocigotos manifiestos”. En este trabajo se han identificado 4 mutaciones nuevas que habrían pasado inadvertidas en análisis de ADN genómico “convencional”.
3. Se propone una nueva estrategia de diagnóstico molecular que permite el estudio de los efectos patogénicos de mutaciones y variantes genómicas que alteran el *splicing*, basada en la extracción de ARN y secuenciación del ADNc del gen *PYGM* a partir de sangre periférica total, lo que lograría evitar la biopsia en pacientes con la enfermedad de McArdle.
4. Se ha demostrado una ausencia de proteína GPM en los pacientes con la enfermedad de McArdle independientemente del tipo de mutación genética presente, hecho consistente con la falta total de actividad de la enzima ampliamente descrito en la literatura.
 - 4.1. Los transcritos del gen *PYGM* que no presentan codones prematuros de terminación (PTCs), y por tanto, son resistentes a la acción protectora del mecanismo “nonsense mediated decay” (NMD), sufren procesos de traducción activa, por lo que, la ausencia de GPM, parece ser debida a la degradación de la misma inmediatamente tras ser sintetizada.
5. La ausencia de GPM en pacientes conlleva la desregulación de puntos clave en el control del metabolismo del músculo esquelético.
 - 5.1. Una disminución de los niveles y del grado de fosforilación de SERCA1.

- 5.2. Una reducción en la cantidad de GS activa, y un desplazamiento hacia su forma inactiva, lo que sugiere un efecto protector de sobrecarga de glucógeno en el músculo.
- 5.3. Glucógeno sintasa (GS) y GPM parecen colocalizar en el músculo, de tal manera, que la ausencia de GP en los pacientes parece romper el equilibrio de los complejos que forman entre sí, desplazando la GS hacia complejos no activos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Murray RK, Granner, Daryl K., Mayes, Peter, A., Rodwell, Víctor W.F. . Bioquímica de Harper. El Manual Moderno 1992:132.
2. Mathews CK, Van Holde, K.E. Bioquímica. 1ª. Edición. 1998:521,522,523,626,627,628,629,630,631,632,633.
3. Leloir LF. [Not Available]. Rev Asoc Med Argent 1957;71:450-451.
4. Lehninger AL. Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. 1991:824.
5. Barford D, Johnson LN. The allosteric transition of glycogen phosphorylase. Nature 1989;340:609-616.
6. Jett MF, Soderling TR. Purification and phosphorylation of rat liver glycogen synthase. J Biol Chem 1979;254:6739-6745.
7. Nimmo HG, Proud CG, Cohen P. The purification and properties of rabbit skeletal muscle glycogen synthase. Eur J Biochem 1976;68:21-30.
8. Bouskila M, Hirshman MF, Jensen J, Goodyear LJ, Sakamoto K. Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;294:E28-35.
9. Bruno C, Cassandrini D, Assereto S, Akman HO, Minetti C, Di Mauro S. Neuromuscular forms of glycogen branching enzyme deficiency. Acta Myol 2007;26:75-78.
10. DiMauro S, Spiegel R. Progress and problems in muscle glycogenoses. Acta Myol 2011;30:96-102.
11. Merk T, Wibmer T, Schumann C, Kruger S. Glycogen storage disease type II (Pompe disease)--influence of enzyme replacement therapy in adults. Eur J Neurol 2009;16:274-277.
12. Moses SW. Muscle glycogenosis. J Inherit Metab Dis 1990;13:452-465.
13. Servidei S, DiMauro S. Disorders of glycogen metabolism of muscle. Neurol Clin 1989;7:159-178.
14. Angelini C, Semplicini C. Enzyme Replacement Therapy for Pompe Disease. Curr Neurol Neurosci Rep.
15. Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S, et al. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. Neurology 1981;31:51-57.

16. Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, et al. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 2002;58:1773-1778.
17. Yang Z, McMahon CJ, Smith LR, et al. Danon disease as an underrecognized cause of hypertrophic cardiomyopathy in children. *Circulation* 2005;112:1612-1617.
18. Bernier AV, Sentner CP, Correia CE, et al. Hyperlipidemia in glycogen storage disease type III: effect of age and metabolic control. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:729-732.
19. Lucchiari S, Pagliarani S, Salani S, et al. Hepatic and neuromuscular forms of glycogenosis type III: nine mutations in AGL. *Hum Mutat* 2006;27:600-601.
20. Moses SW, Parvari R. The variable presentations of glycogen storage disease type IV: a review of clinical, enzymatic and molecular studies. *Curr Mol Med* 2002;2:177-188.
21. Greene HL, Brown BI, McClenathan DT, Agostini RM, Jr., Taylor SR. A new variant of type IV glycogenosis: deficiency of branching enzyme activity without apparent progressive liver disease. *Hepatology* 1988;8:302-306.
22. Bruno C, van Diggelen OP, Cassandrini D, et al. Clinical and genetic heterogeneity of branching enzyme deficiency (glycogenosis type IV). *Neurology* 2004;63:1053-1058.
23. Konstantinidou AE, Anninos H, Dertinger S, et al. Placental involvement in glycogen storage disease type IV. *Placenta* 2008;29:378-381.
24. Yamasaki T, Nakajima H. [Phosphofructokinase (PFK)]. *Nippon Rinsho* 2004;62 Suppl 12:835-839.
25. Shin YS. Glycogen storage disease: clinical, biochemical, and molecular heterogeneity. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:115-120.
26. Toscano A, Musumeci O. Tarui disease and distal glycogenoses: clinical and genetic update. *Acta Myol* 2007;26:105-107.
27. Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, DiMauro S. The molecular genetic basis of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Muscle Nerve* 1995;3:S23-27.
28. Engel WK. Adenosine Triphosphatase of Sarcoplasmic Reticulum Triads and Sarcolemma Identified Histochemically. *Nature* 1963;200:588-589.
29. Pourmand R, Sanders DB, Corwin HM. Late-onset McArdle's disease with unusual electromyographic findings. *Arch Neurol* 1983;40:374-377.
30. Felice KJ, Schneebaum AB, Jones HR, Jr. McArdle's disease with late-onset symptoms: case report and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:407-408.

31. Wolfe GI, Baker NS, Haller RG, Burns DK, Barohn RJ. McArdle's disease presenting with asymmetric, late-onset arm weakness. *Muscle Nerve* 2000;23:641-645.
32. Rommel O, Kley RA, Dekomien G, Epplen JT, Vorgerd M, Hasenbring M. Muscle pain in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): the role of gender, genotype, and pain-related coping. *Pain* 2006;124:295-304.
33. Rubio JC, Garcia-Consuegra I, Nogales-Gadea G, et al. A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum Mutat* 2007;28:203-204.
34. Schroder JM, Dodel R, Weis J, Stefanidis I, Reichmann H. Mitochondrial changes in muscle phosphoglycerate kinase deficiency. *Clin Neuropathol* 1996;15:34-40.
35. Rosa R, George C, Fardeau M, Calvin MC, Rapin M, Rosa J. A new case of phosphoglycerate kinase deficiency: PGK Creteil associated with rhabdomyolysis and lacking hemolytic anemia. *Blood* 1982;60:84-91.
36. DiMauro S, Dalakas M, Miranda AF. Phosphoglycerate kinase deficiency: another cause of recurrent myoglobinuria. *Ann Neurol* 1983;13:11-19.
37. Sugie H, Sugie Y, Ito M, Fukuda T. A novel missense mutation (837T-->C) in the phosphoglycerate kinase gene of a patient with a myopathic form of phosphoglycerate kinase deficiency. *J Child Neurol* 1998;13:95-97.
38. Vissing J, Schmalbruch H, Haller RG, Clausen T. Muscle phosphoglycerate mutase deficiency with tubular aggregates: effect of dantrolene. *Ann Neurol* 1999;46:274-277.
39. Tsujino S, Shanske S, Sakoda S, Fenichel G, DiMauro S. The molecular genetic basis of muscle phosphoglycerate mutase (PGAM) deficiency. *Am J Hum Genet* 1993;52:472-477.
40. Comi GP, Fortunato F, Lucchiari S, et al. Beta-enolase deficiency, a new metabolic myopathy of distal glycolysis. *Ann Neurol* 2001;50:202-207.
41. Maekawa M, Sudo K, Kanno T, Li SS. Molecular characterization of genetic mutation in human lactate dehydrogenase-A (M) deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:677-682.
42. Kanno T, Sudo K, Maekawa M, Nishimura Y, Ukita M, Fukutake K. Lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: a new type of hereditary exertional myopathy. *Clin Chim Acta* 1988;173:89-98.
43. Kreuder J, Borkhardt A, Repp R, et al. Brief report: inherited metabolic myopathy and hemolysis due to a mutation in aldolase A. *N Engl J Med* 1996;334:1100-1104.
44. Bromstrad EE, B. Needle biopsy technique for fiber type determination in human skeletal muscle a methodological study. *Acta Physiol. Scand.* 1982;116:437 – 442.

45. Dubowitz VB, M. Muscle Biopsy. A practical approach. London, 1985.
46. Guth L, Samaha FJ. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp Neurol* 1970;28:365-367.
47. Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000;23:1456-1471.
48. Hasselbach W. Atp-Driven Active Transport of Calcium in the Membranes of the Sarcoplasmic Reticulum. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1964;160:501-504.
49. Inesi G. Sequential mechanism of calcium binding and translocation in sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1987;262:16338-16342.
50. Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH. Adult forms of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987;262:3768-3774.
51. Mata AM, Lee AG, East JM. Probing the nucleotide-binding site of sarcoplasmic reticulum (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase with anti-fluorescein antibodies. *FEBS Lett* 1989;253:273-275.
52. Mata AM, Matthews I, Tunwell RE, Sharma RP, Lee AG, East JM. Definition of surface-exposed and trans-membranous regions of the (Ca^{2+})- Mg^{2+})-ATPase of sarcoplasmic reticulum using anti-peptide antibodies. *Biochem J* 1992;286 (Pt 2):567-580.
53. Stefanova HI, Mata AM, East JM, Gore MG, Lee AG. Reactivity of lysyl residues on the (Ca^{2+})- Mg^{2+})-ATPase to 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid succinimidyl ester. *Biochemistry* 1993;32:356-362.
54. Stefanova HI, Mata AM, Gore MG, East JM, Lee AG. Labeling the (Ca^{2+})- Mg^{2+})-ATPase of sarcoplasmic reticulum at Glu-439 with 5-(bromomethyl)fluorescein. *Biochemistry* 1993;32:6095-6103.
55. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 2000;405:647-655.
56. Toyoshima C, Nomura H, Sugita Y. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 2003;555:106-110.
57. Toyoshima C, Nomura H, Sugita Y. Crystal structures of Ca^{2+} -ATPase in various physiological states. *Ann N Y Acad Sci* 2003;986:1-8.
58. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987;56:395-433.
59. McArdle B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin. Sci* 1951;10:13-33.

60. Mommaerts WF, Illingworth B, Pearson CM, Guillory RJ, Seraydarian K. A Functional Disorder of Muscle Associated with the Absence of Phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1959;45:791-797.
61. Schmid R, Mahler R. Chronic progressive myopathy with myoglobinuria: demonstration of a glycogenolytic defect in the muscle. *J Clin Invest* 1959;38:2044-2058.
62. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, 1987.
63. Browner MF, Fauman EB, Fletterick RJ. Tracking conformational states in allosteric transitions of phosphorylase. *Biochemistry* 1992;31:11297-11304.
64. Krebs HA. The regulation of metabolic processes. *Tex Rep Biol Med* 1959;17:16-28.
65. Hudson JW, Golding GB, Crerar MM. Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol* 1993;234:700-721.
66. Lukacs CM, Oikonomakos NG, Crowther RL, et al. The crystal structure of human muscle glycogen phosphorylase a with bound glucose and AMP: an intermediate conformation with T-state and R-state features. *Proteins* 2006;63:1123-1126.
67. Fletterick RJ, Madsen NB. The structures and related functions of phosphorylase a. *Annu Rev Biochem* 1980;49:31-61.
68. Johnson LN, Wilson KS, Weber IT, Wild DL, Jenkins JA, Stura EA. Crystallographic studies on the structure and function of glycogen phosphorylase b. *Biochem Soc Trans* 1978;6:1108-1111.
69. Barford D, Johnson LN. The molecular mechanism for the tetrameric association of glycogen phosphorylase promoted by protein phosphorylation. *Protein Sci* 1992;1:472-493.
70. Chebotareva NA, Sugrobova NP, Bulanova LN, Poznanskaya AA, Kurganov BI, Gunar VI. Interaction of muscle glycogen phosphorylase b reconstituted from apoenzyme and analogs of pyridoxal-5'-phosphate with specific ligands. *Biochem Mol Biol Int* 1996;38:1033-1040.
71. Denessiouk KA, Denesyuk AI, Lehtonen JV, Korpela T, Johnson MS. Common structural elements in the architecture of the cofactor-binding domains in unrelated families of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Proteins* 1999;35:250-261.
72. Muller-Esterl W, Brandt U. *Bioquímica : fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Barcelona: : Reverté, 2008.
73. DiMauro S, Hartlage PL. Fatal infantile form of muscle phosphorylase deficiency. *Neurology* 1978;28:1124-1129.

74. el-Schahawi M, Bruno C, Tsujino S, et al. Sudden infant death syndrome (SIDS) in a family with myophosphorylase deficiency. *Neuromuscul Disord* 1997;7:81-83.
75. Takeuchi T, Kuriaki H. Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J Histochem Cytochem* 1955;3:153-160.
76. Mitumoto H. McArdle disease: phosphorylase activity in regenerating muscle fibers. *Neurology* 1979;29:258-262.
77. Kazemi-Esfarjani P, Skomorowska E, Jensen TD, Haller RG, Vissing J. A nonischemic forearm exercise test for McArdle disease. *Ann Neurol* 2002;52:153-159.
78. Burke J, Hwang P, Anderson L, Lebo R, Gorin F, Fletterick R. Intron/exon structure of the human gene for the muscle isozyme of glycogen phosphorylase. *Proteins* 1987;2:177-187.
79. Andreu AL, Nogales-Gadea G, Cassandrini D, Arenas J, Bruno C. McArdle disease: molecular genetic update. *Acta Myol* 2007;26:53-57.
80. Aquaron R, Berge-LeFranc JL, Pellissier JF, et al. Molecular characterization of myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in 34 patients from Southern France: identification of 10 new mutations. Absence of genotype-phenotype correlation. *Neuromuscul Disord* 2007;17:235-241.
81. Bruno C, Cassandrini D, Martinuzzi A, et al. McArdle disease: the mutation spectrum of PYGM in a large Italian cohort. *Hum Mutat* 2006;27:718.
82. Deschauer M, Morgenroth A, Joshi PR, et al. Analysis of spectrum and frequencies of mutations in McArdle disease. Identification of 13 novel mutations. *J Neurol* 2007;254:797-802.
83. Vieitez I, Teijeira S, Fernandez JM, et al. Molecular and clinical study of McArdle's disease in a cohort of 123 European patients. Identification of 20 novel mutations. *Neuromuscul Disord* 2011.
84. Wu Y, Weber JL, Vladutiu GD, Tarnopolsky MA. Six novel mutations in the myophosphorylase gene in patients with McArdle disease and a family with pseudo-dominant inheritance pattern. *Mol Genet Metab* 2011;104:587-591.
85. Gamez J, Fernandez R, Bruno C, et al. A new mutation in the regulatory domain of the myophosphorylase gene affecting protein dimer contact. *Muscle Nerve* 1999;22:1136-1138.
86. Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *N Engl J Med* 1993;329:241-245.

87. Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Auciello R, Cabello A, Arenas J. A missense mutation W797R in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Muscle Nerve* 2000;23:129-131.
88. Vorgerd M, Kubisch C, Burwinkel B, et al. Mutation analysis in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Ann Neurol* 1998;43:326-331.
89. Rubio JC, Lucia A, Fernandez-Cadenas I, et al. Novel mutation in the PYGM gene resulting in McArdle disease. *Arch Neurol* 2006;63:1782-1784.
90. Vieitez I, Teijeira S, Millan BS, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:343.
91. Bartram C, Edwards RH, Clague J, Beynon RJ. McArdle's disease: a rare frameshift mutation in exon 1 of the muscle glycogen phosphorylase gene. *Biochim Biophys Acta* 1994;1226:341-343.
92. Isackson PJ, Tarnopolsky M, Vladutiu GD. A novel mutation in the PYGM gene in a family with pseudo-dominant transmission of McArdle disease. *Mol Genet Metab* 2005;85:239-242.
93. Vieitez I, Teijeira S, Otolano S, Parente P, San Millan B, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:351.
94. Duno M, Quinlivan R, Vissing J, Schwartz M. High-resolution melting facilitates mutation screening of PYGM in patients with McArdle disease. *Ann Hum Genet* 2009;73:292-297.
95. Vieitez I, Teijeira S, Miranda S, San Millan B, Navarro C. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2008;124:300.
96. Wu Y, Weber JL, Vladutiu GD, Tarnopolsky MA. Six novel mutations in the myophosphorylase gene in patients with McArdle disease and a family with pseudo-dominant inheritance pattern. *Mol Genet Metab* 2011;104:587-591.
97. Hadjigeorgiou GM, Papadimitriou A, Musumeci O, et al. A new stop codon mutation (Y52X) in the myophosphorylase gene in a Greek patient with McArdle's disease. *J Neurol Sci* 2002;194:83-86.
98. Vieitez I, Teijeira S, Miranda S, San Millan B, Navarro C. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2008;123:114.
99. Deschauer M, Hertel K, Zierz S. Two novel mutations in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Muscle Nerve* 2003;27:105-107.
100. Martin MA, Rubio JC, Buchbinder J, et al. Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol* 2001;50:574-581.

101. Martin MA, Rubio JC, Wevers RA, et al. Molecular analysis of myophosphorylase deficiency in Dutch patients with McArdle's disease. *Ann Hum Genet* 2004;68:17-22.
102. Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Vilchez J, Cabello A, Arenas J. Two homozygous mutations (R193W and 794/795 delAA) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Hum Mutat* 2000;15:294.
103. Vieitez I, Teijeira S, Millan BS, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:335.
104. Garcia-Consuegra I, Rubio JC, Nogales-Gadea G, et al. Novel mutations in patients with McArdle disease by analysis of skeletal muscle mRNA. *J Med Genet* 2009;46:198-202.
105. Vieitez I, Teijeira S, Miranda S, San Millan B, Navarro C. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2008;124:294-295.
106. Deschauer M, Opalka JR, Lindner A, Zierz S. A novel nonsense mutation (R269X) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Mol Genet Metab* 2001;74:489-491.
107. Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, et al. Three new mutations in patients with myophosphorylase deficiency (McArdle disease). *Am J Hum Genet* 1994;54:44-52.
108. Vieitez I, Teijeira S, Millan BS, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:339.
109. Vieitez I, Teijeira S, San Millan B, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:339.
110. Bruno C, Tamburino L, Kawashima N, et al. A nonsense mutation in the myophosphorylase gene in a Japanese family with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 1999;9:34-37.
111. Martin MA, Rubio JC, Garcia A, et al. Resolution of a mispaired secondary structure intermediate could account for a novel micro-insertion/deletion (387 insA/del 8 bp) in the PYGM gene causing McArdle's disease. *Clin Genet* 2001;59:48-51.
112. Vieitez I, Teijeira S, Millan BS, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:337.
113. Vieitez I, Teijeira S, Millan BS, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:338.

114. Mancuso M, Filosto M, Tsujino S, et al. Muscle glycogenosis and mitochondrial hepatopathy in an infant with mutations in both the myophosphorylase and deoxyguanosine kinase genes. *Arch Neurol* 2003;60:1445-1447.
115. Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Cabello A, Arenas J. A missense mutation T487N in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 2000;10:138-140.
116. Dimauro S, Andreu AL, Bruno C, Hadjigeorgiou GM. Myophosphorylase deficiency (glycogenosis type V; McArdle disease). *Curr Mol Med* 2002;2:189-196.
117. Tsujino S, Shanske S, Goto Y, Nonaka I, DiMauro S. Two mutations, one novel and one frequently observed, in Japanese patients with McArdle's disease. *Hum Mol Genet* 1994;3:1005-1006.
118. Bruno C, Lofberg M, Tamburino L, et al. Molecular characterization of McArdle's disease in two large Finnish families. *J Neurol Sci* 1999;165:121-125.
119. Gamez J, Rubio JC, Martin MA, et al. Two novel mutations in the muscle glycogen phosphorylase gene in McArdle's disease. *Muscle Nerve* 2003;28:380-382.
120. Paradas C, Fernandez-Cadenas I, Gallardo E, et al. Variable presentation of the clinical phenotype of McArdle's disease in a kindred harbouring a novel compound genotype in the muscle glycogen phosphorylase gene. *Neurosci Lett* 2005;391:28-31.
121. Hadjigeorgiou GM, Sadeh M, Musumeci O, et al. Molecular genetic study of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease) in two Yemenite-Jewish families. *Neuromuscul Disord* 2002;12:824-827.
122. Vieitez I, Teijeira S, San Millan B, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:349.
123. Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Ricoy JR, Cabello A, Arenas J. A homozygous missense mutation (A659D) in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 2000;10:447-449.
124. Vieitez I, Teijeira S, Miranda S, San Millan B, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2010;127:114-115.
125. Andreu AL, Bruno C, Tamburino L, et al. A new mutation in the myophosphorylase gene (Asn684Tyr) in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 1999;9:171-173.
126. Martinuzzi A, Schievano G, Nascimbeni A, Fanin M. McArdle's disease. The unsolved mystery of the reappearing enzyme. *Am J Pathol* 1999;154:1893-1897.

127. Bruno C, Lanzillo R, Biedi C, Iadicicco L, Minetti C, Santoro L. Two new mutations in the myophosphorylase gene in Italian patients with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 2002;12:498-500.
128. Quintans B, Sanchez-Andrade A, Teijeira S, et al. A new rare mutation (691delCC/insAAA) in exon 17 of the PYGM gene causing McArdle disease. *Arch Neurol* 2004;61:1108-1110.
129. Kubisch C, Wicklein EM, Jentsch TJ. Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum Mutat* 1998;12:27-32.
130. Vieitez I, Teijeira S, San Millan B, Navarro C. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2008;124:307.
131. Sohn EH, Kim HS, Lee AY, Fukuda T, Sugie H, Kim DS. A novel PYGM mutation in a Korean patient with McArdle disease: The role of nonsense-mediated mRNA decay. *Neuromuscul Disord* 2008.
132. Fernandez R, Navarro C, Andreu AL, et al. A novel missense mutation (W797R) in the myophosphorylase gene in Spanish patients with McArdle disease. *Arch Neurol* 2000;57:217-219.
133. Vieitez I, Teijeira S, San Millan B, Navarro C. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2008;124:320.
134. Vieitez I, Teijeira S, Otolano S, Parente P, San Millan B, Navarro C. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:352.
135. Delmont E, Sacconi S, Berge-LeFranc JL, Aquaron R, Butori C, Desnuelle C. [McArdle disease (glycogenosis type V): Analysis of clinical, biological and genetic features of five French patients.]. *Rev Neurol (Paris)* 2008.
136. Vissing J, Duno M, Schwartz M, Haller RG. Splice mutations preserve myophosphorylase activity that ameliorates the phenotype in McArdle disease. *Brain* 2009;132:1545-1552.
137. Garcia-Consuegra I, Rubio JC, Nogales-Gadea G, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:343.
138. Garcia-Consuegra I, Rubio JC, Nogales-Gadea G, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 2009;125:342.
139. Visser G, Herwig J, Rake JP, Niezen-Koning KE, Verhoeven AJ, Smit GP. Neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1c. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:227-231.

140. Fernandez-Cadenas I, Andreu AL, Gamez J, et al. Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease. *Neurology* 2003;61:1432-1434.
141. Nogales-Gadea G, Rubio JC, Fernandez-Cadenas I, et al. Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mutat* 2008;29:277-283.
142. Mort M, Ivanov D, Cooper DN, Chuzhanova NA. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat* 2008;29:1037-1047.
143. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 2004;36:801-808.
144. Wilkinson MF. A new function for nonsense-mediated mRNA-decay factors. *Trends Genet* 2005;21:143-148.
145. Kuzmiak HA, Maquat LE. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 2006;12:306-316.
146. Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, Roberts RG. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* 2001;109:402-407.
147. Lejeune F, Maquat LE. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:309-315.
148. Usuki F, Yamashita A, Higuchi I, et al. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann Neurol* 2004;55:740-744.
149. Usuki F, Yamashita A, Kashima I, Higuchi I, Osame M, Ohno S. Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay components, SMG-1 or Upf1, rescues the phenotype of Ullrich disease fibroblasts. *Mol Ther* 2006;14:351-360.
150. Clavero S, Perez B, Rincon A, Ugarte M, Desviat LR. Qualitative and quantitative analysis of the effect of splicing mutations in propionic acidemia underlying non-severe phenotypes. *Hum Genet* 2004;115:239-247.
151. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003;17:419-437.
152. Cooper TA. A reversal of misfortune for myotonic dystrophy? *N Engl J Med* 2006;355:1825-1827.
153. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 1992;90:41-54.

154. Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002;18:123-127.
155. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3:285-298.
156. Pagani F, Buratti E, Stuani C, Baralle FE. Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9. *J Biol Chem* 2003;278:26580-26588.
157. Blencowe BJ. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 2000;25:106-110.
158. Pozzoli U, Sironi M. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1579-1604.
159. Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T. The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *Rna* 2001;7:806-818.
160. Mayeda A, Krainer AR. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 1992;68:365-375.
161. Long JC, Cáceres JF. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 2009;417:15-27.
162. Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 2004;5:389-396.
163. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3568-3571.
164. Wang J, Smith PJ, Krainer AR, Zhang MQ. Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Res* 2005;33:5053-5062.
165. Cartegni L, Krainer AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 2003;10:120-125.
166. Nielsen KB, Sorensen S, Cartegni L, et al. Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet* 2007;80:416-432.
167. Sironi M, Menozzi G, Riva L, et al. Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1783-1791.
168. Coutinho G, Xie J, Du L, Brusco A, Krainer AR, Gatti RA. Functional significance of a deep intronic mutation in the ATM gene and evidence for an alternative exon 28a. *Hum Mutat* 2005;25:118-124.

169. Grellscheid SN, Smith CW. An apparent pseudo-exon acts both as an alternative exon that leads to nonsense-mediated decay and as a zero-length exon. *Mol Cell Biol* 2006;26:2237-2246.
170. Metherell LA, Akker SA, Munroe PB, et al. Pseudoexon activation as a novel mechanism for disease resulting in atypical growth-hormone insensitivity. *Am J Hum Genet* 2001;69:641-646.
171. Tuffery-Giraud S, Saquet C, Chambert S, Claustres M. Pseudoexon activation in the DMD gene as a novel mechanism for Becker muscular dystrophy. *Hum Mutat* 2003;21:608-614.
172. Spena S, Tenchini ML, Buratti E. Cryptic splice site usage in exon 7 of the human fibrinogen Bbeta-chain gene is regulated by a naturally silent SF2/ASF binding site within this exon. *Rna* 2006;12:948-958.
173. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:89-99.
174. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:14-26.
175. Suwanmanee T, Sierakowska H, Fucharoen S, Kole R. Repair of a splicing defect in erythroid cells from patients with beta-thalassemia/HbE disorder. *Mol Ther* 2002;6:718-726.
176. Friedman KJ, Silverman LM. Cystic fibrosis syndrome: a new paradigm for inherited disorders and implications for molecular diagnostics. *Clin Chem* 1999;45:929-931.
177. Madsen EC, Morcos PA, Mendelsohn BA, Gitlin JD. In vivo correction of a Menkes disease model using antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3909-3914.
178. Vetrini F, Tammara R, Bondanza S, et al. Aberrant splicing in the ocular albinism type 1 gene (OA1/GPR143) is corrected in vitro by morpholino antisense oligonucleotides. *Hum Mutat* 2006;27:420-426.
179. Davis RL, Homer VM, George PM, Brennan SO. A deep intronic mutation in FGB creates a consensus exonic splicing enhancer motif that results in afibrinogenemia caused by aberrant mRNA splicing, which can be corrected in vitro with antisense oligonucleotide treatment. *Hum Mutat* 2009;30:221-227.
180. Aartsma-Rus A, Janson AA, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 2007;8:43.

181. Du L, Pollard JM, Gatti RA. Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6007-6012.
182. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447:87-91.
183. McConchie SM, Coakley J, Edwards RH, Beynon RJ. Molecular heterogeneity in McArdle's disease. *Biochim Biophys Acta* 1990;1096:26-32.
184. Delmont E, Sacconi S, Berge-LeFranc JL, Aquaron R, Butori C, Desnuelle C. [McArdle disease (glycogenosis type V): analysis of clinical, biological and genetic features of five French patients]. *Rev Neurol (Paris)* 2008;164:912-916.
185. Iyengar S, Kalinsky H, Weiss S, et al. Homozygosity by descent for a rare mutation in the myophosphorylase gene is associated with variable phenotypes in a Druze family with McArdle disease. *J Med Genet* 1997;34:391-394.
186. Milstein JM, Herron TM, Haas JE. Fatal infantile muscle phosphorylase deficiency. *J Child Neurol* 1989;4:186-188.
187. Miranda AF, Nette EG, Hartlage PL, DiMauro S. Phosphorylase isoenzymes in normal and myophosphorylase-deficient human heart. *Neurology* 1979;29:1538-1541.
188. Rubio JC, Martin MA, Del Hoyo P, et al. Molecular analysis of Spanish patients with AMP deaminase deficiency. *Muscle Nerve* 2000;23:1175-1178.
189. Tsujino S, Shanske S, Carroll JE, Sabina RL, DiMauro S. Double trouble: combined myophosphorylase and AMP deaminase deficiency in a child homozygous for nonsense mutations at both loci. *Neuromuscul Disord* 1995;5:263-266.
190. Rubio JC, Martin MA, Bautista J, et al. Myophosphorylase deficiency associated with a defect in complex I of the mitochondrial respiratory chain. *J Neurol Sci* 1998;161:110-113.
191. Isaacs H, Badenhorst ME, Du Sautoy C. Myophosphorylase B deficiency and malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 1989;12:203-205.
192. Lucia A, Mate-Munoz JL, Perez M, Foster C, Gutierrez-Rivas E, Arenas J. Double trouble (McArdle's disease and myasthenia gravis): how can exercise help? *Muscle Nerve* 2007;35:125-128.
193. Martinuzzi A, Sartori E, Fanin M, et al. Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency. *Ann Neurol* 2003;53:497-502.
194. Rubio JC, Gomez-Gallego F, Santiago C, et al. Genotype modulators of clinical severity in McArdle disease. *Neurosci Lett* 2007;422:217-222.

195. Rubio JC, Perez M, Mate-Munoz JL, et al. AMPD1 genotypes and exercise capacity in McArdle patients. *Int J Sports Med* 2008;29:331-335.
196. Scriver CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 1999;15:267-272.
197. Dipple KM, McCabe ER. Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab* 2000;71:43-50.
198. Dipple KM, McCabe ER. Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet* 2000;66:1729-1735.
199. Mate-Munoz JL, Moran M, Perez M, et al. Favorable responses to acute and chronic exercise in McArdle patients. *Clin J Sport Med* 2007;17:297-303.
200. Quinlivan R, Beynon RJ. Pharmacological and nutritional treatment for McArdle's disease (Glycogen Storage Disease type V). *Cochrane Database Syst Rev* 2004:CD003458.
201. Vandenberghe K, Goris M, Van Hecke P, Van Leemputte M, Vangerven L, Hespel P. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *J Appl Physiol* 1997;83:2055-2063.
202. Haller RG. Treatment of McArdle disease. *Arch Neurol* 2000;57:923-924.
203. Vorgerd M, Zange J, Kley R, et al. Effect of high-dose creatine therapy on symptoms of exercise intolerance in McArdle disease: double-blind, placebo-controlled crossover study. *Arch Neurol* 2002;59:97-101.
204. Vissing J, Haller RG. A diagnostic cycle test for McArdle's disease. *Ann Neurol* 2003;54:539-542.
205. Andersen ST, Vissing J. Carbohydrate- and protein-rich diets in McArdle disease: Effects on exercise capacity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008.
206. Perez M, Foster C, Gonzalez-Freire M, Arenas J, Lucia A. One-year follow-up in a child with McArdle disease: exercise is medicine. *Pediatr Neurol* 2008;38:133-136.
207. Haller RG, Wyrick P, Taivassalo T, Vissing J. Aerobic conditioning: an effective therapy in McArdle's disease. *Ann Neurol* 2006;59:922-928.
208. Perez M, Mate-Munoz JL, Foster C, et al. Exercise capacity in a child with McArdle disease. *J Child Neurol* 2007;22:880-882.
209. Vissing J, Haller RG. The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease. *N Engl J Med* 2003;349:2503-2509.

210. Amato AA. Sweet success--a treatment for McArdle's disease. *N Engl J Med* 2003;349:2481-2482.
211. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 2003;349:1433-1441.
212. Schroers A, Kley RA, Stachon A, et al. Gentamicin treatment in McArdle disease: failure to correct myophosphorylase deficiency. *Neurology* 2006;66:285-286.
213. Phoenix J, Hopkins P, Bartram C, Beynon RJ, Quinlivan RC, Edwards RH. Effect of vitamin B6 supplementation in McArdle's disease: a strategic case study. *Neuromuscul Disord* 1998;8:210-212.
214. Gomez-Gallego F, Santiago C, Moran M, et al. The I allele of the ACE gene is associated with improved exercise capacity in women with McArdle disease. *Br J Sports Med* 2008;42:134-140.
215. Onder G, Penninx BW, Balkrishnan R, et al. Relation between use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and muscle strength and physical function in older women: an observational study. *Lancet* 2002;359:926-930.
216. Martinuzzi A, Liava A, Trevisi E, et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial of ramipril in McArdle's disease. *Muscle Nerve* 2008;37:350-357.
217. Steele IC, Patterson VH, Nicholls DP. A double blind, placebo controlled, crossover trial of D-ribose in McArdle's disease. *J Neurol Sci* 1996;136:174-177.
218. Day TJ, Mastaglia FL. Depot-glucagon in the treatment of McArdle's disease. *Aust N Z J Med* 1985;15:748-750.
219. MacLean D, Vissing J, Vissing SF, Haller RG. Oral branched-chain amino acids do not improve exercise capacity in McArdle disease. *Neurology* 1998;51:1456-1459.
220. Kushner RF, Berman SA. Are high-protein diets effective in McArdle's disease? *Arch Neurol* 1990;47:383-384.
221. Lane RJ, Turnbull DM, Hudgson P, Walton J. Trials of verapamil and dantrolene sodium in McArdle disease. *Muscle Nerve* 1984;7:592-594.
222. Newton RU, Galvao DA. Exercise in prevention and management of cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2008;9:135-146.
223. Perez M, Moran M, Cardona C, et al. Can patients with McArdle's disease run? *Br J Sports Med* 2007;41:53-54.
224. Angelos S, Valberg SJ, Smith BP, et al. Myophosphorylase deficiency associated with rhabdomyolysis and exercise intolerance in 6 related Charolais cattle. *Muscle Nerve* 1995;18:736-740.

225. Tsujino S, Shanske S, Valberg SJ, Cardinet GH, 3rd, Smith BP, DiMauro S. Cloning of bovine muscle glycogen phosphorylase cDNA and identification of a mutation in cattle with myophosphorylase deficiency, an animal model for McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 1996;6:19-26.
226. Tan P, Allen JG, Wilton SD, Akkari PA, Huxtable CR, Laing NG. A splice-site mutation causing ovine McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 1997;7:336-342.
227. Howell JM, Walker KR, Davies L, et al. Adenovirus and adeno-associated virus-mediated delivery of human myophosphorylase cDNA and LacZ cDNA to muscle in the ovine model of McArdle's disease: expression and re-expression of glycogen phosphorylase. *Neuromuscul Disord* 2008;18:248-258.
228. Pari G, Crerar MM, Nalbantoglu J, et al. Myophosphorylase gene transfer in McArdle's disease myoblasts in vitro. *Neurology* 1999;53:1352-1354.
229. Sambrook J FE MT. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2ª Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
230. Vivanco F, Padial LR, Darde VM, et al. Proteomic Biomarkers of Atherosclerosis. *Biomark Insights* 2008;3:101-113.
231. DiMauro S, Hartwig GB, Hays A, et al. Debrancher deficiency: neuromuscular disorder in 5 adults. *Ann Neurol* 1979;5:422-436.
232. Askanas V, Gallez-Hawkins G. Synergistic influence of polypeptide growth factors on cultured human muscle. *Arch Neurol* 1985;42:749-752.
233. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994;32:9-15.
234. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
235. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-4021.
236. Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, Sanchez JC, Hochstrasser D. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 1993;14:1357-1365.
237. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3406-3415.
238. Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 1988;333:858-860.
239. Chelly J, Gilgenkrantz H, Hugnot JP, et al. Illegitimate transcription. Application to the analysis of truncated transcripts of the dystrophin gene in nonmuscle

- cultured cells from Duchenne and Becker patients. *J Clin Invest* 1991;88:1161-1166.
240. Blazquez L, Azpitarte M, Saenz A, et al. Characterization of novel CAPN3 isoforms in white blood cells: an alternative approach for limb-girdle muscular dystrophy 2A diagnosis. *Neurogenetics* 2008;9:173-182.
 241. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* 2002;51:129-133.
 242. De Luna N, Freixas A, Gallano P, et al. Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul Disord* 2007;17:69-76.
 243. Nielsen JN, Wojtaszewski JF, Haller RG, et al. Role of 5'AMP-activated protein kinase in glycogen synthase activity and glucose utilization: insights from patients with McArdle's disease. *J Physiol* 2002;541:979-989.
 244. Carty TJ, Tu JI, Graves DJ. Regulation of glycogen phosphorylase. Role of the peptide region surrounding the phosphoserine residue in determining enzyme properties. *J Biol Chem* 1975;250:4980-4985.
 245. el-Schahawi M, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. Diagnosis of McArdle's disease by molecular genetic analysis of blood. *Neurology* 1996;47:579-580.
 246. Andreu AL, Bruno C, Gamez J, et al. Molecular genetic analysis of McArdle's disease in Spanish patients. *Neurology* 1998;51:260-262.
 247. Fernandez-Cadenas I, Nogales-Gadea G, Llige D, et al. [Private mutations in the myophosphorylase gene: the first case in a patient of Latin American descent]. *Rev Neurol* 2007;45:280-283.
 248. Nogales-Gadea G, Mormeneo E, Garcia-Consuegra I, et al. Expression of Glycogen Phosphorylase Isoforms in Cultured Muscle from Patients with McArdle's Disease Carrying the p.R771PfsX33 PYGM Mutation. *PLoS One*;5.
 249. Levy J, Abu-Ras MT, Berenstein T, et al. Postnatal regression of glucose transport in a patient with glycogen storage disease type 1b. *J Inherit Metab Dis* 1994;17:16-22.
 250. Manfredi G, Silvestri G, Servidei S, et al. Manifesting heterozygotes in McArdle's disease: clinical, morphological and biochemical studies in a family. *J Neurol Sci* 1993;115:91-94.
 251. Schmidt B, Servidei S, Gabbai AA, Silva AC, de Sousa Bulle de Oliveira A, DiMauro S. McArdle's disease in two generations: autosomal recessive transmission with manifesting heterozygote. *Neurology* 1987;37:1558-1561.
 252. Andersen ST, Duno M, Schwartz M, Vissing J. Do carriers of PYGM mutations have symptoms of McArdle disease? *Neurology* 2006;67:716-718.

253. Kinniburgh AJ, Maquat LE, Schedl T, Rachmilewitz E, Ross J. mRNA-deficient beta o-thalassemia results from a single nucleotide deletion. *Nucleic Acids Res* 1982;10:5421-5427.
254. Leeds P, Peltz SW, Jacobson A, Culbertson MR. The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 1991;5:2303-2314.
255. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr Biol* 2002;12:R196-197.
256. Sun X, Maquat LE. Nonsense-mediated decay: assaying for effects on selenoprotein mRNAs. *Methods Enzymol* 2002;347:49-57.
257. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 1999;8:1893-1900.
258. Cheng J, Belgrader P, Zhou X, Maquat LE. Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance. *Mol Cell Biol* 1994;14:6317-6325.
259. Zhang J, Maquat LE. Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Embo J* 1997;16:826-833.
260. Correa-Cerro LS, Wassif CA, Waye JS, et al. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 2005;42:350-357.
261. Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 2002;11:2805-2814.
262. Montfort M, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D. Analysis of nonsense-mediated mRNA decay in mutant alleles identified in Spanish Gaucher disease patients. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:46-52.
263. Chan SS, Longley MJ, Naviaux RK, Copeland WC. Mono-allelic POLG expression resulting from nonsense-mediated decay and alternative splicing in a patient with Alpers syndrome. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:1381-1389.
264. Nogales-Gadea G, Arenas J, Andreu AL. Molecular genetics of McArdle's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007;7:84-92.
265. Eeds AM, Hall LD, Yadav M, et al. The frequent observation of evidence for nonsense-mediated decay in RNA from patients with carbamyl phosphate synthetase I deficiency. *Mol Genet Metab* 2006;89:80-86.
266. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987;15:7155-7174.

267. Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 1998;23:198-199.
268. Illa I, De Luna N, Dominguez-Perles R, et al. Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 2007;68:1284-1289.
269. Dehainault C, Michaux D, Pages-Berhouet S, et al. A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation. *Eur J Hum Genet* 2007;15:473-477.
270. Bateman JF, Freddi S, Natrass G, Savarirayan R. Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Hum Mol Genet* 2003;12:217-225.
271. Resta N, Susca FC, Di Giacomo MC, et al. A homozygous frameshift mutation in the ESCO2 gene: evidence of intertissue and interindividual variation in Nmd efficiency. *J Cell Physiol* 2006;209:67-73.
272. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 2007;117:683-692.
273. Krahn M, Pecheux C, Chapon F, et al. Transcriptional explorations of CAPN3 identify novel splicing mutations, a large-sized genomic deletion and evidence for messenger RNA decay. *Clin Genet* 2007;72:582-592.
274. Lualdi S, Pittis MG, Regis S, et al. Multiple cryptic splice sites can be activated by IDS point mutations generating misspliced transcripts. *J Mol Med* 2006;84:692-700.
275. Du M, Keeling KM, Fan L, et al. Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model. *J Mol Med* 2006;84:573-582.
276. Du M, Liu X, Welch EM, Hirawat S, Peltz SW, Bedwell DM. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2064-2069.
277. Finkel RS. Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/ Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J Child Neurol*;25:1158-1164.
278. Aurino S, Nigro V. Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 2006;25:5-12.
279. Zeitlin PL. Emerging drug treatments for cystic fibrosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 2007;12:329-336.

280. Matsuo M, Takeshima Y. [Mutation-specific treatments for Duchenne muscular dystrophy]. *Brain Nerve* 2009;61:915-922.
281. Warner JR, Knopf PM, Rich A. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1963;49:122-129.
282. Martinez-Azorin F, Remacha M, Ballesta JP. Functional characterization of ribosomal P1/P2 proteins in human cells. *Biochem J* 2008;413:527-534.
283. Arava Y, Boas FE, Brown PO, Herschlag D. Dissecting eukaryotic translation and its control by ribosome density mapping. *Nucleic Acids Res* 2005;33:2421-2432.
284. Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003;12:907-914.
285. van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001;10:1547-1554.
286. Lucia A, Nogales-Gadea G, Perez M, Martin MA, Andreu AL, Arenas J. McArdle disease: what do neurologists need to know? *Nat Clin Pract Neurol* 2008;4:568-577.
287. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 1998;4:1441-1444.
288. Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, Deconinck AE, Davies KE. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet* 1998;19:79-82.
289. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S. Epsilon-sarcoglycan compensates for lack of alpha-sarcoglycan in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2005;14:775-783.
290. Purintrapiban J, Wang M, Forsberg NE. Identification of glycogen phosphorylase and creatine kinase as calpain substrates in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:531-540.
291. Kollberg G, Tulinius M, Gilljam T, et al. Cardiomyopathy and exercise intolerance in muscle glycogen storage disease O. *N Engl J Med* 2007;357:1507-1514.
292. Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N, Richter EA. Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E1267-1275.
293. Brody IA. Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. *N Engl J Med* 1969;281:187-192.

294. Saks VA, Ventura-Clapier R, Huchua ZA, Preobrazhensky AN, Emelin IV. Creatine kinase in regulation of heart function and metabolism. I. Further evidence for compartmentation of adenine nucleotides in cardiac myofibrillar and sarcolemmal coupled ATPase-creatine kinase systems. *Biochim Biophys Acta* 1984;803:254-264.
295. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19:1720-1730.
296. Lawrence JC, Jr., Roach PJ. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* 1997;46:541-547.
297. Amoresano A, Cirulli C, Monti G, Quemeneur E, Marino G. The analysis of phosphoproteomes by selective labelling and advanced mass spectrometric techniques. *Methods Mol Biol* 2009;527:173-190, ix.
298. Misquitta CM, Mack DP, Grover AK. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 1999;25:277-290.
299. Misquitta CM, Sing A, Grover AK. Control of sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump expression in cardiac and smooth muscle. *Biochem J* 1999;338 (Pt 1):167-173.
300. Sorensen TL, Moller JV, Nissen P. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* 2004;304:1672-1675.
301. Dode L, Vilsen B, Van Baelen K, Wuytack F, Clausen JD, Andersen JP. Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* 2002;277:45579-45591.
302. Margreth A, Damiani E, Bortoloso E. Sarcoplasmic reticulum in aged skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1999;167:331-338.
303. Zhang Y, Fujii J, Phillips MS, et al. Characterization of cDNA and genomic DNA encoding SERCA1, the Ca(2+)-ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for Brody disease. *Genomics* 1995;30:415-424.
304. Hirata Y, Atsumi M, Ohizumi Y, Nakahata N. Mastoparan binds to glycogen phosphorylase to regulate sarcoplasmic reticular Ca²⁺ release in skeletal muscle. *Biochem J* 2003;371:81-88.
305. Haller RG, Clausen T, Vissing J. Reduced levels of skeletal muscle Na⁺K⁺ -ATPase in McArdle disease. *Neurology* 1998;50:37-40.
306. Lees SJ, Franks PD, Spangenburg EE, Williams JH. Glycogen and glycogen phosphorylase associated with sarcoplasmic reticulum: effects of fatiguing activity. *J Appl Physiol* 2001;91:1638-1644.

307. Weiss JN, Lamp ST. Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science* 1987;238:67-69.
308. Meyer F, Heilmeyer LM, Jr., Haschke RH, Fischer EH. Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. I. Isolation and characterization of the protein-glycogen complex. *J Biol Chem* 1970;245:6642-6648.
309. Friden J, Seger J, Ekblom B. Topographical localization of muscle glycogen: an ultrahistochemical study in the human vastus lateralis. *Acta Physiol Scand* 1989;135:381-391.
310. Cuenda A, Nogues M, Henao F, Gutierrez-Merino C. Interaction between glycogen phosphorylase and sarcoplasmic reticulum membranes and its functional implications. *J Biol Chem* 1995;270:11998-12004.
311. Entman ML, Keslensky SS, Chu A, Van Winkle WB. The sarcoplasmic reticulum-glycogenolytic complex in mammalian fast twitch skeletal muscle. Proposed in vitro counterpart of the contraction-activated glycogenolytic pool. *J Biol Chem* 1980;255:6245-6252.
312. Wanson JC, Drochmans P. Role of the sarcoplasmic reticulum in glycogen metabolism. Binding of phosphorylase, phosphorylase kinase, and primer complexes to the sarcovesicles of rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol* 1972;54:206-224.
313. Cuenda A, Centeno F, Gutierrez-Merino C. Modulation by phosphorylation of glycogen phosphorylase-sarcoplasmic reticulum interaction. *FEBS Lett* 1991;283:273-276.
314. Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, Brady MJ. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E1-8.
315. Mutalik VK, Venkatesh KV. Quantification of the glycogen cascade system: the ultrasensitive responses of liver glycogen synthase and muscle phosphorylase are due to distinctive regulatory designs. *Theor Biol Med Model* 2005;2:19.
316. Papadimitriou A, Manta P, Divari R, Karabetsos A, Papadimitriou E, Bresolin N. McArdle's disease: two clinical expressions in the same pedigree. *J Neurol* 1990;237:267-270.
317. Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, et al. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 1999;20:2100-2110.
318. Sinha P, Hutter G, Kottgen E, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing. *Electrophoresis* 1999;20:2961-2969.

319. Celis JE, Ostergaard M, Basse B, et al. Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res* 1996;56:4782-4790.
320. Celis JE, Ostergaard M, Rasmussen HH, et al. A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *Electrophoresis* 1999;20:300-309.
321. Giometti CS, Williams K, Tollaksen SL. A two-dimensional electrophoresis database of human breast epithelial cell proteins. *Electrophoresis* 1997;18:573-581.
322. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9212-9217.
323. Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, et al. Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1994;15:382-390.
324. Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, et al. Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis* 1997;18:599-604.
325. Lawson SR, Latter G, Miller DS, et al. Quantitative protein changes in metastatic versus primary epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1991;41:22-27.
326. Jin M, Diaz PT, Bourgeois T, Eng C, Marsh CB, Wu HM. Two-dimensional gel proteome reference map of blood monocytes. *Proteome Sci* 2006;4:16.
327. Baggerly KA, Morris JS, Coombes KR. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics* 2004;20:777-785.
328. Rae DE, Noakes TD, San Juan AF, et al. Excessive skeletal muscle recruitment during strenuous exercise in McArdle patients. *Eur J Appl Physiol* 2011;110:1047-1055.

A continuación de adjuntan dos artículos originales publicados como consecuencia de parte de los resultados de este trabajo, así como un manuscrito que se encuentra en revisión para su publicación.

Novel mutations in patients with McArdle disease by analysis of skeletal muscle mRNA

I García-Consuegra,^{1,2} J C Rubio,^{1,2} G Nogales-Gadea,^{2,3} J Bautista,⁴ S Jiménez,^{1,2} A Cabello,^{2,5} A Lucía,⁶ A L Andreu,^{2,3} J Arenas,^{1,2} M A Martín^{1,2}

¹ Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Barcelona, Spain; ³ Centre d'Investigacions en Bioquímica y Biología Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁴ Servicio de Neurología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla; ⁵ Servicio de Neuropatología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁶ Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

Correspondence to:
Dr M A Martín, Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain;
mamcasanueva@h12o.es

Received 8 April 2008
Revised 24 June 2008
Accepted 1 July 2008

ABSTRACT

Objective: To identify pathogenic mutant alleles of the *PYGM* gene in “genetic manifesting heterozygous” patients with McArdle disease—that is, those in whom we could only find a sole mutant allele by genomic DNA analysis.

Methods: We studied four unrelated patients. PCR-RFLP, gene sequencing, and muscle cDNA analysis were performed to search for mutations in the *PYGM* gene. The effects of the mutations were evaluated by *in silico* analysis, and gene expression was assessed by real-time polymerase chain reaction (PCR).

Results: Patient 1 was a compound heterozygous for the p.G205S missense mutation and for a novel “in frame” mutation, p.Q176_M177insVQ, resulting from a retention of six nucleotides from the 3'-end sequence of intron 4. Patient 2 was heterozygous for the common nonsense mutation p.R50X, and for a 1094 bp, c.1969+214_2177+369del mutation, spanning from intron 16 to intron 17 sequences. Furthermore, mRNA expression level was dramatically reduced consistent with nonsense mediated decay. Patient 3 was heterozygous for the p.R50X substitution, and patient 4 was heterozygous for the relatively common private Spanish mutation p.W798R. These two patients harboured a heterozygous exonic synonymous variant, p.K215K. Quantification of gene transcripts in patient 3 revealed a drastic decrease in the relative expression of the gene, which strongly supports the possibility of nonsense mediated decay.

Conclusions: Our results indicate that skeletal muscle cDNA studies in “genetic manifesting heterozygous” patients with McArdle disease are prone to identify their second mutant allele.

Mutations in the skeletal muscle isoform of the glycogen phosphorylase gene (*PYGM*, myophosphorylase; MIM 608455) result in glycogen storage disease type V (McArdle disease, GSDV; MIM 232600), the most common glycogenolytic disorder in skeletal muscle. The diagnosis is often in the second or third decade of life manifesting as exercise intolerance, premature fatigue and muscle weakness during exercise, frequently accompanied by myalgia and cramps, and sometimes myoglobinuria.¹ Molecular heterogeneity has been demonstrated by the identification of more than 95 different mutations described to date.^{2–6} The most common mutation in Caucasian populations is p.R50X (with an allelic frequency ranging from 31–72%).^{6,7} Although McArdle disease is thought to be inherited as a recessive disorder, in some patients, the so-called “genetic manifesting heterozygotes”, only one allele with a pathogenic mutation has been identified.^{1–8}

Disturbances at mRNA processing were described as the underlying molecular mechanism for some *PYGM* gene mutations. In particular the p.R50X and most of frameshift mutations resulting in premature termination codons (PTCs) undergo mRNA nonsense mediated decay,⁹ and an exonic synonymous variant (p.K609K) leads to abnormal mRNA splicing species.¹⁰

We report four unrelated patients with McArdle disease in whom we found a sole mutant pathogenic allele in the *PYGM* gene by genomic DNA analysis.¹¹ We studied cDNA from these patients in an attempt to identify the second mutant allele. Different mutations and mutant molecular mechanisms are described, suggesting that transcript analysis is a valuable approach in the definitive molecular characterisation of those patients with McArdle disease previously considered to be “genetic manifesting heterozygotes”.

PATIENTS AND METHODS

Patients and controls

We studied five patients belonging to four unrelated families (one patient was the brother of patient 4) with McArdle disease proven by histochemical and biochemical deficiency of myophosphorylase in skeletal muscle (table 1). Age at diagnosis ranged from 25–58 years. Common features of the disease were observed in all patients—that is, long term history of exercise intolerance (including the “second-wind phenomenon”) since childhood presenting with myalgia, cramps, and persistent elevated resting serum creatine kinase followed by sharp increases after crisis (range 2300–15000 U/l, normal <170 U/l). All patients had at least one episode of myoglobinuria. Muscle weakness was present in three patients (patients 2, 4 and his brother), all of them >45 years of age. In three patients (patients 3, 4 and his brother) an ischaemic forearm exercise test was performed showing a flat-response curve of lactate and an exaggerated increase in serum ammonia profile. Electromyogram was performed in two patients (patients 1 and 2) revealing signs of mild myopathy.

Genomic DNA samples from muscle or blood from 200 healthy individuals and cDNA from muscle of 30 controls were analysed to discard the presence of the novel mutations in the general population.

Written consent was obtained from all individuals. The study was approved by the institutional ethics committee (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) and was in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research.



Novel mutations in patients with McArdle disease by analysis of skeletal muscle mRNA

I García-Consuegra, J C Rubio, G Nogales-Gadea, et al.

J Med Genet 2009 46: 198-202

doi: 10.1136/jmg.2008.059469

Updated information and services can be found at:

<http://jmg.bmj.com/content/46/3/198.full.html>

These include:

References

This article cites 19 articles, 5 of which can be accessed free at:

<http://jmg.bmj.com/content/46/3/198.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

[Genetic screening / counselling](#) (688 articles)

[Molecular genetics](#) (1044 articles)

[Metabolic disorders](#) (268 articles)

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

Expression of Glycogen Phosphorylase Isoforms in Cultured Muscle from Patients with McArdle's Disease Carrying the *p.R771PfsX33* *PYGM* Mutation

Gisela Nogales-Gadea^{1,5*}, Emma Mormeneo^{2,6*}, Inés García-Consuegra^{3,5}, Juan C. Rubio^{3,5}, Anna Orozco^{2,6}, Joaquin Arenas³, Miguel A. Martín^{3,5}, Alejandro Lucia⁴, Anna M. Gómez-Foix^{2,6}, Ramon Martí^{1,5*}, Antoni L. Andreu^{1,5}

1 Departament de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, **2** Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, **4** Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain, **5** Spanish Network for Research in Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **6** Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract

Background: Mutations in the *PYGM* gene encoding skeletal muscle glycogen phosphorylase (GP) cause a metabolic disorder known as McArdle's disease. Previous studies in muscle biopsies and cultured muscle cells from McArdle patients have shown that *PYGM* mutations abolish GP activity in skeletal muscle, but that the enzyme activity reappears when muscle cells are in culture. The identification of the GP isoenzyme that accounts for this activity remains controversial.

Methodology/Principal Findings: In this study we present two related patients harbouring a novel *PYGM* mutation, *p.R771PfsX33*. In the patients' skeletal muscle biopsies, *PYGM* mRNA levels were ~60% lower than those observed in two matched healthy controls; biochemical analysis of a patient muscle biopsy resulted in undetectable GP protein and GP activity. A strong reduction of the *PYGM* mRNA was observed in cultured muscle cells from patients and controls, as compared to the levels observed in muscle tissue. In cultured cells, *PYGM* mRNA levels were negligible regardless of the differentiation stage. After a 12 day period of differentiation similar expression of the brain and liver isoforms were observed at the mRNA level in cells from patients and controls. Total GP activity (measured with AMP) was not different either; however, the active GP activity and immunoreactive GP protein levels were lower in patients' cell cultures. GP immunoreactivity was mainly due to brain and liver GP but muscle GP seemed to be responsible for the differences.

Conclusions/Significance: These results indicate that in both patients' and controls' cell cultures, unlike in skeletal muscle tissue, most of the protein and GP activities result from the expression of brain GP and liver GP genes, although there is still some activity resulting from the expression of the muscle GP gene. More research is necessary to clarify the differential mechanisms of metabolic adaptations that McArdle cultures undergo *in vitro*.

Citation: Nogales-Gadea G, Mormeneo E, García-Consuegra I, Rubio JC, Orozco A, et al. (2010) Expression of Glycogen Phosphorylase Isoforms in Cultured Muscle from Patients with McArdle's Disease Carrying the *p.R771PfsX33* *PYGM* Mutation. PLoS ONE 5(10): e13164. doi:10.1371/journal.pone.0013164

Editor: Francesc Palau, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Spain

Received: June 29, 2010; **Accepted:** September 11, 2010; **Published:** October 5, 2010

Copyright: © 2010 Nogales-Gadea et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: GN was supported by a contract from CIBER de Enfermedades Raras, Spain. EM was the recipient of a FPI fellowship from the MCI. IG was supported by a contract from FIS, Madrid, Spain. JCR was supported by a contract from FIS (CA05/0039). MAM was supported by the programme 'Intensificación de la Actividad Investigadora' from ISCIII, and Comunidad de Madrid. This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) grant number: PI0890246, PI061183, PI07/0347; Ministerio de Ciencia y Innovación (MCI) grant number SAF2009-07559; CIBER de Enfermedades Raras and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, which is an ISCIII project, Spain; Fundación Isabel Gemio para la investigación en distrofias musculares y otras enfermedades raras. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rmarti@ir.vhebron.net

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Glycogen phosphorylase (GP) is a finely regulated key enzyme in the metabolism of glycogen. Its 1,4- α -glucan-phosphate-glucosyltransferase activity catalyzes a limiting step in glycogenolysis, i.e. glycogen phosphorolysis to form glucose-1-P [1]. There are three different GP isoenzymes encoded by three different genes, apparently evolved from a common ancestral gene, i.e. *PYGB* (brain) *PYGL* (liver), and *PYGM* (skeletal muscle) [2].

In 1959, lack of muscle GP was identified as the cause of a glycogenolytic defect confined to the skeletal muscles [3,4]. The

clinical features of this disorder, known as McArdle's disease or glycogenolysis type V had first been described a few years earlier by Brian McArdle [5], and encompass exercise intolerance with reversible acute crises of premature fatigue, myalgia and contractures, sometimes accompanied by severe rhabdomyolysis and myoglobinuria; these episodes are triggered by static or isometric muscle contractions as well as by dynamic, strenuous exercises such as running [6].

Since the publication of the first pathogenic *PYGM* mutations in 1993 [7,8], a growing allelic heterogeneity of the *PYGM* gene has been reported, with more than 100 mutations known to cause

McArdle's disease [9]. A stop-codon mutation, *p.R50X*, is commonly encountered in European and American patients with an allelic frequency ranging from 81% to 43% in different populations. However, most mutations are private, i.e. reported in a single patient or in the members of the same family [9]. Moreover, studies on skeletal muscle cDNA resulted in: (i) the identification of mutations that genomic direct analysis failed to detect, and (ii) understanding the effect of *PYGM* mutations in gene expression [10]. An RNA surveillance mechanism known as 'nonsense mediated mRNA decay' (NMD), reduces the mRNA levels of those transcripts that contain nonsense and frameshift mutations [11]. Our previous results support the notion that NMD is a common acting mechanism among McArdle patients, with 92% of them showing a reduced amount of *PYGM* mRNA levels [12].

GP activity in muscle biopsies and cultured muscle cells from McArdle patients has previously been studied. No detectable GP activity is observed in muscle biopsies from patients; however, cultured muscle cells derived from the same biopsies did present GP activity [13,14,15,16]. It has also been described in regenerative fibers from McArdle patients [17]. This phenomenon was described as "the mystery of the reappearing enzyme" [17,18], although it is not clear which specific GP isoform accounts for this activity, i.e. brain isoform [15], brain and liver isoform [16] vs. skeletal muscle isoform [13,14].

In this study we have characterized the molecular alterations produced by a novel frameshift *PYGM* mutation (*p.R771PfsX33*), at the mRNA and protein levels, in the skeletal muscle biopsy of two related McArdle patients. In addition, we also cultured skeletal muscle cells, determined the expression of the different GP isoforms, and characterized the glycogen metabolism by determining GP activity, glycogen synthase (GS) activity and glycogen content.

Methods

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all individuals. The study was approved by the institutional review board of the University Hospital 12 de Octubre and was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research.

Subjects

We report two Caucasian brothers (index case P1, and P2), aged 43 and 51 years, from a small village in southern Spain, with family history of consanguinity but not of neuromuscular diseases. They both presented the four cardinal features of the disease [6]: (i) exercise intolerance since childhood; (ii) high serum levels of creatine kinase (CK) activity, even in basal conditions ($672 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ and $344 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ at the moment of study, after 2 resting days, normal $<170 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$); (iii) previous episodes of hyper-CK-emia ($\sim 7,000$ and $10,000 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$) plus myoglobinuria after intense exercise, indicating marked rhabdomyolysis; and (iv) the 'second wind' phenomenon, depicted by a sudden, marked improvement tolerance to aerobic dynamic exercise (notably, brisk walking) after ~ 8 – 10 minutes of exercise or after a short period of rest [19]. Their peak oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{peak}}$) measured during incremental cycle-ergometer testing was very low (12.5 and $13.0 \text{ ml O}_2/\text{kg}/\text{min}$), barely above the limits for independent living, which reflects a markedly decreased muscle oxidative capacity, another common feature of the disease [20]. Two sex- and age-matched healthy Spanish volunteers recruited for the study (C1, C2) served as controls (Table 1). Their $\text{VO}_{2\text{peak}}$ was 36 and $38 \text{ ml O}_2/\text{kg}/\text{min}$.

Table 1. Subjects' information.

Subject	Age*	Sex	<i>PYGM</i> genotype	<i>PYGM</i> mRNA (%)
P1	44	Male	<i>p.R771PfsX33/p.R771PfsX33</i>	40
P2	55	Male	<i>p.R771PfsX33/p.R771PfsX33</i>	32
C1	43	Male	wild type/wild type	94
C2	46	Male	wild type/wild type	107

*Age at the time the skeletal muscle biopsy was collected. GenBank reference sequence was NP_005600.1. Expression values were calculated considering 100% the mean results obtained in the controls (C1, C2).
doi:10.1371/journal.pone.0013164.t001

Biochemical and genetic analyses

McArdle's disease was suspected on clinical bases in the index case (P1). A muscle biopsy was obtained to assess glycogen phosphorylase activity, which was undetectable. Thus, the diagnosis was confirmed genetically by *PYGM* sequencing in P1 and his brother (P2), who was also clinically affected (see above). *PYGM* gene was sequenced as follows: DNA was isolated from whole blood using a standard phenol-chloroform method (Nucleon BACC-2, GE healthcare Europe GmbH, Chalfont St. Giles, UK). We amplified the coding sequence of the entire *PYGM* gene by polymerase chain reaction (PCR) in 14 fragments, using the primers described by Kubisch et al [21]. For PCR analysis and sequencing, we followed the steps described elsewhere [22]. In order to perform a more exhaustive screening, we performed *PYGM* amplification of cDNA samples (see below), with a different set of primers [12].

Muscle samples

We obtained a *biceps* biopsy from P1 for diagnostic purposes (GP activity assessment) and immunoblotting. Once McArdle's disease was confirmed, a new *biceps* biopsy was obtained from P1, as well as from P2, C1 and C2, for research purposes. Each biopsy specimen was divided in two fragments, for myoblast isolation and for RNA extraction.

Muscle cell culture, immunohistochemistry and electron microscopy

Myoblast cell populations were isolated from muscle biopsies using the explant culture technique [23]. Myoblasts were grown in DMEM/M-199 medium, 3:1, with 10% fetal bovine serum (FBS), $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 2 mM glutamine, $25 \text{ ng}/\text{ml}$ fibroblast growth factor and $10 \text{ ng}/\text{ml}$ epidermal growth factor. Confluent cells were induced to differentiate for 7 or 12 days by removing fibroblast and epidermal growth factors. Twenty-four hours before the metabolic experiments, cells were depleted of insulin and FBS. For immunohistochemistry analyses, cells grown on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, then washed with PBS followed by 3 sequential treatments with PBS containing: (1) 20 mM glycine, (2) 0.1% Triton X-100 and (3) 1% BSA. Next, coverslips were incubated with a rabbit anti-desmin antibody (AB907 Millipore, Billerica, MA, USA). The primary antibody was detected with an Alexa Fluor-488 goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Both primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution. Nuclei were stained with Hoechst ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) after secondary antibody incubation. After staining, samples were mounted and analyzed with a Leica TCS SP2 confocal microscope. For electron microscopy, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4), then cells were scraped in PB and post-fixed with 1%

osmium tetroxide in PB containing 0.8% potassium ferricyanide at 4°C. Then cells were dehydrated in acetone, infiltrated in Epon resin for 2 days, embedded in the same resin and polymerised at 60°C during 48 h. Ultrathin sections were obtained using a Leica Ultracut UCT ultramicrotome and mounted on Formvar-coated copper grids. They were stained with 2% uranyl acetate in water and lead citrate. Then sections were observed in a JEM-1010 electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). The diameter size of glycogen granules was measured with AnalySIS (Soft Imaging System, Olympus, Hamburg, Germany). The amount and diameter of glycogen particles were measured in images of myotubes obtained at x 30,000 magnification. Five cells from C1 and P1 and three different cell areas per cell were examined.

cDNA synthesis

Total RNA was extracted from the biopsies and cultured cells using Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). To eliminate any traces of DNA, RNA was treated with the DNase I, amplification grade (Invitrogen, Carlsbad, USA). The RNA concentration and quality was measured with NanoChips, using the Bioanalyzer 2100 system and the 2100 Expert Software version B.02.02 (Agilent, Santa Clara, USA). cDNA was synthesized from muscle RNA using the high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), which uses random primers.

Real Time PCR analysis

GP mRNA levels were quantified by real-time PCR, using TaqMan fluorogenic probes in a 7,500 Real Time PCR System (Applied biosystems, Foster City, USA). We used a probe located in exons 6–7 for the detection of *PYGM* mRNA (Hs00194493_m1), a probe located in exons 5–6 for *PYGB* mRNA (Hs00267875_m1), and a probe located in exons 3–4 for *PYGL* mRNA (Hs00161132_m1). Results were normalized to cyclophilin A (*PPIA*) mRNA levels (probe Hs009999904_m1). The real time PCR was performed as described elsewhere [12]. When comparing gene expression levels between C2 skeletal muscle biopsy specimen and its corresponding cell culture, we used the amount of total RNA per well to normalize the results. Similar efficiencies of amplification were observed for the *PGTM*, *PYGB*, *PYGL* and *PPIA* cDNAs.

Enzyme activity and glycogen assays

GP activity was measured in the muscle biopsy of patient P1 following the standard procedure [24]. In order to measure GS and GP activities in the cultured cells, we used 100 µl of homogenization buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM KF, 15 mM EDTA, 600 mM sucrose, 15 mM 2-mercaptoethanol, 17 µg/l leupeptin, 1 mM benzamidine and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) to scrape frozen plates containing the cell monolayers prior to sonication. The homogenates were used to determine enzyme activities. GP activity was determined by the incorporation of [14 C] glucose 1-phosphate into glycogen in the absence (activated GP) or presence (total GP) of the allosteric activator AMP (1 mM) [25]. GS activity was measured in the absence (activated GS) or presence (total GS) of 10 mM glucose 6-P as described [26]. Aliquots of the homogenates were used to measure protein concentration. Glycogen was extracted from cell monolayers as previously described [27] and released glucose quantified with the Glucose (HK) assay kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA).

Immunoblotting analysis

Skeletal muscle biopsies were homogenated in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 1% SDS. Cell extracts prepared as

described above were mixed 1:1 with a homogenization buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 µg/µl benzamidine, 2 µg/µl leupeptin, 1% (v/v) Nonidet P40, and 1 mM dithiothreitol. Lysates were then gently rocked for 60 min at 4°C, and stored at −80°C until analysis. Protein was resolved in 10% SDS-PAGE. Antibodies against muscle GS (3893, Cell Signaling, Danvers, USA), brain/muscle GP (4GP31/17B6, HyTest, Turku, Finland), muscle GP in biopsy (AB63158, Abcam, Cambridge, UK) and for muscle GP in cell cultures (LS-A2284 MBL International Corporation, Woburn, USA), brain GP (BB-1F9:SC-81751, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and liver GP (HPA000962, Sigma, St. Louis, USA) were utilized. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used and membranes were developed with ECL-Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Bands were obtained with a LAS-3000 (FujiFilm, Tokyo, Japan) and quantified with NIH image J, version 1.37 analysis software (Scion image, NIH). α -Actin (C-terminal anti-actin antibody, Sigma, Saint Louis, USA) and α -tubulin (Sigma, Saint Louis, USA) were used as housekeeping proteins.

Statistical analysis

We performed all statistical analysis with the SPSS package (SPSS 12.0, Chicago, IL, USA). The Mann Whitney's *U* test was used to analyze differences between the two groups (patients and controls).

Results

Genetic analysis

Sequencing of the PCR products spanning the entire *PYGM* gene coding region revealed the presence of a homozygous CC duplication in the exon 18 (*c.2310_2311dupCC*) in both patients (Figure 1A). This mutation changes arginine to proline in the position 771 of the protein and alters the open reading frame predicting a premature stop codon 33 amino acid residues downstream (*p.R771PfsX33*). No other mutations were found in the coding sequence or flanking intronic regions of the *PYGM* gene, nor in the cDNA. The nomenclature of the mutation is referred to the GenBank entries NM_005609.1 (cDNA) and NP_005600.1 (protein).

Differential expression of GP genes in skeletal muscle and cultured cells

Total GP activity was measured in skeletal muscle biopsy from patient P1 and was undetectable. GP activity was not analyzed in P2 muscle because the diagnostic was confirmed in P2 by *PYGM* gene sequencing. Muscle *PYGM* mRNA levels of P1 and P2 were reduced to 40% and 32% respectively, as compared to the mean of C1 and C2 *PYGM* mRNA levels (Table 1). A specific antibody against muscle GP was used to detect this isoform in C1 and P1 muscle homogenates, resulting in the expected 97 kDa muscle GP band in C1, which was absent in P1 (Figure 1B).

While virtually all the mRNA found in C1 and C2 skeletal muscle was the product of the expression of *PYGM* (>99%), this gene poorly contributed (between 0.6 – 2.5%) to the total GP mRNA in undifferentiated cultured cells, either from patients or controls, and only reached moderate contribution (17%) in 12 days differentiated P2 cells (Figure 1C). When referred to total RNA, *PYGM* mRNA levels were approximately 27-fold higher in C2 muscle than in cultured cells. By contrast, *PYGL* mRNA was 17-fold higher in cultured cells, while *PYGB* mRNA levels were similar in muscle tissue and cultured cells (data not shown). The

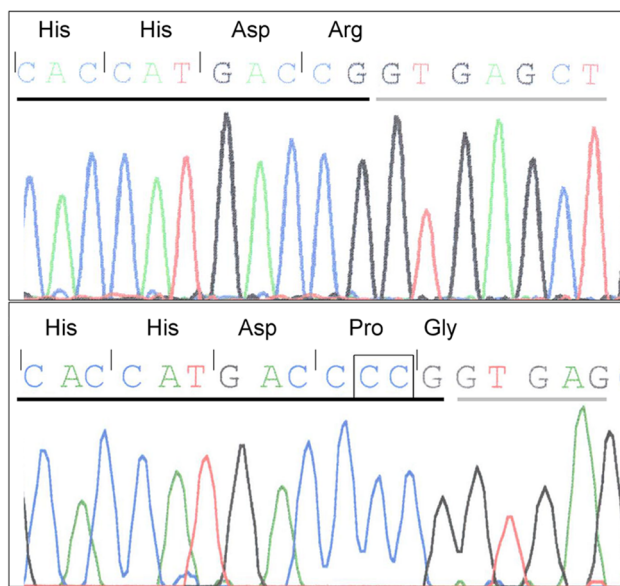
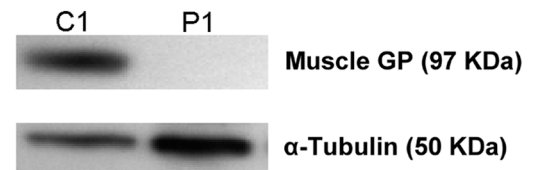
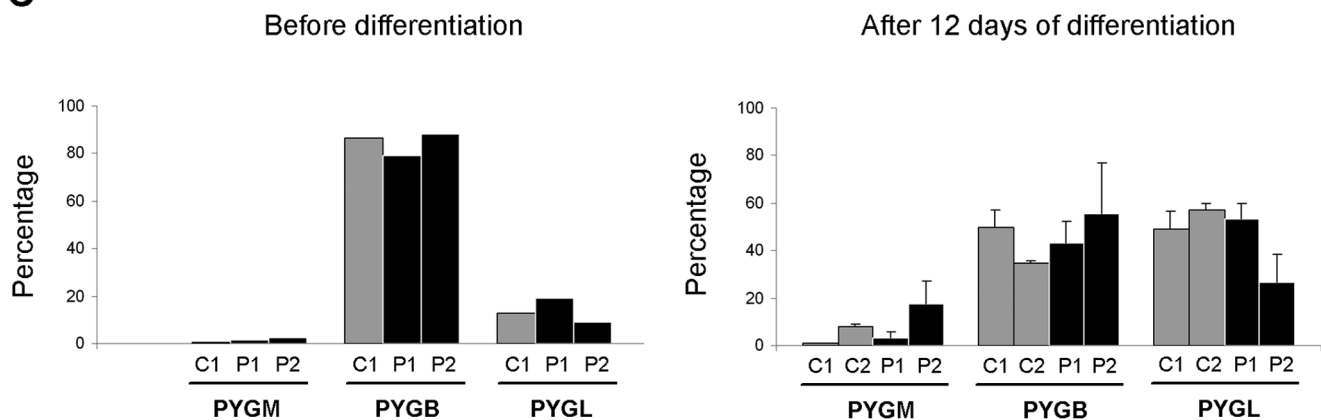
A**B****C**

Figure 1. Molecular effects of *c.2310_2311dupCC* mutation and GP isoforms expression in muscle cells. (A) Electropherogram of *PYGM* exon 18 in control C1 (top) and patient P1 (bottom). The square shows the *c.2310_2311dupCC* mutation. Exonic nucleotides are underlined in black; intronic nucleotides are underlined in grey. Encoded amino acids are indicated (including wild type Arg, and mutant Gly, encoded by codons formed in an exon-exon junction). (B) Immunoblotting showing muscle GP and α -tubulin bands in muscle biopsy homogenates from control C1 and patient P1. (C) Relative contribution of each gene (*PYGM*, *PYGB* and *PYGL*), to the total amount of GP mRNA in undifferentiated and 12 day differentiated cultured muscle cells. Bars represent the result of a single experiment for undifferentiated cells, or mean \pm SD of two independent experiments for 12 days differentiated cells. Percentages were calculated as $[PYG(x) \text{ mRNA} \times 100 / (PYGB \text{ mRNA} + PYGL \text{ mRNA} + PYGM \text{ mRNA})]$, using values normalized for the *PPIA* mRNA. In C1 and C2 skeletal muscle (not shown), *PYGB* mRNA and *PYGL* mRNA were negligible ($<0.5\%$).
doi:10.1371/journal.pone.0013164.g001

relative contribution of each gene (*PYGB* and *PYGL*) to the total amount of GP mRNA in muscle, undifferentiated and differentiated cultured cells was markedly different (Figure 1C). Before differentiation, the major contributor in cell culture of C1, P1 and P2 was *PYGB* gene, while 12 days after differentiation both *PYGB* and *PYGL* genes contributed equally to the total GP mRNA pool in C1, C2 and P1, and moderately higher *PYGB* mRNA was found in P2. However, no significant differences between patients and controls were observed in the relative contributions of each gene in cultured cells. Figure 2 shows the changes in the mRNA levels, product from the three different

genes, over a period of differentiation of 12 days. The inspection of the data did not show obvious differences in the distribution of the mRNA levels between patients and controls for any of the GP isoforms. Overall, *PYGB* mRNA had tendency to decrease with the time in culture, while *PYGL* mRNA seemed to increase. *PYGM* mRNA did not show a clear tendency, except for a moderate increase in 12 day differentiated P2 cells. In absolute amounts, this variation was low when compared to that observed for *PYGB* and *PYGL* mRNAs, due to the minute amounts of *PYGM* mRNA detected in cultured cells as compared to the other isoforms.

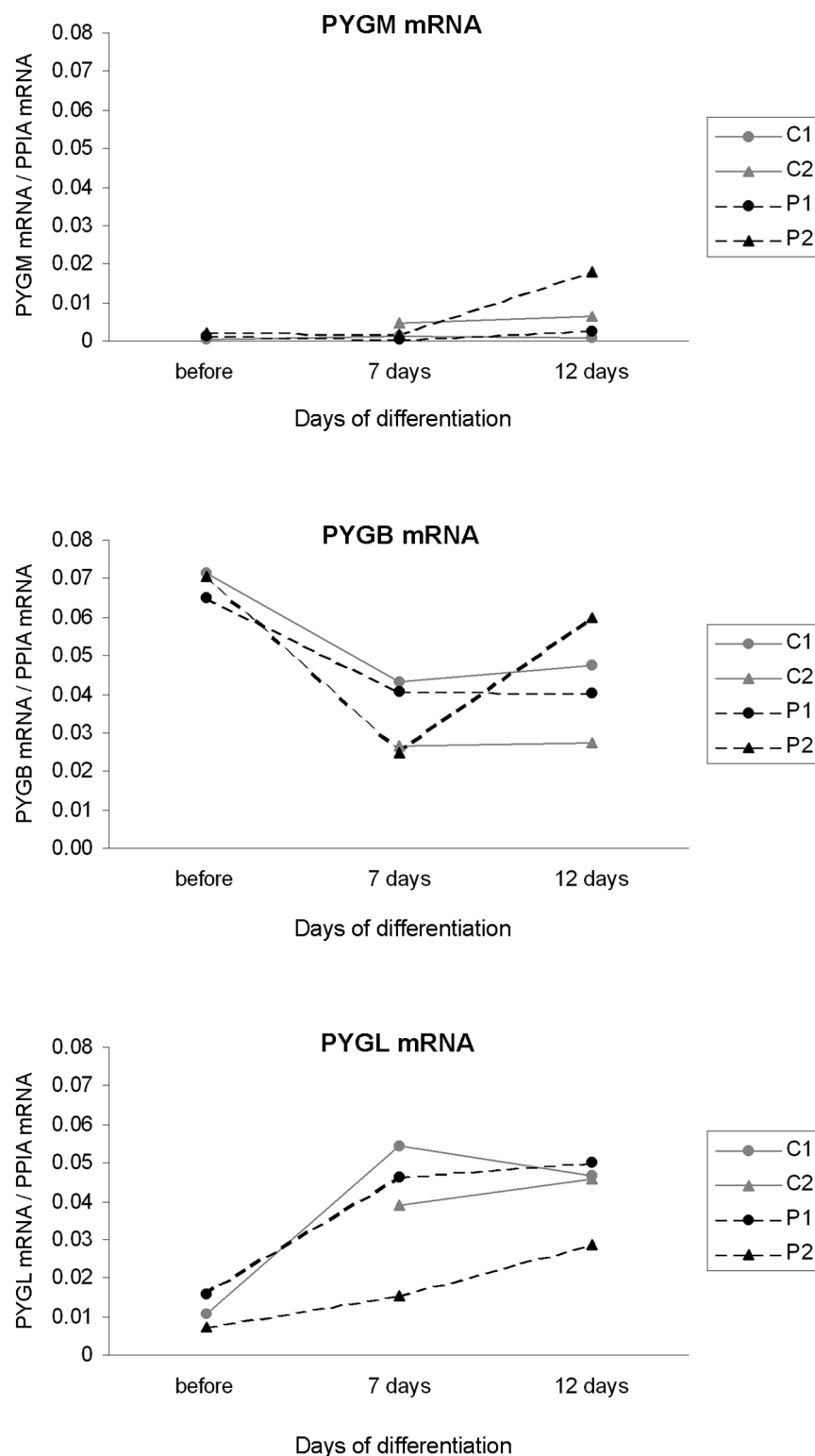


Figure 2. mRNA quantification of GP genes at 0, 7 and 12 days of differentiation. Results from a single experiment (before differentiation; C1, P1 and P2), or mean of two independent experiments (7-day and 12-day differentiation, C1, C2, P1 and P2) are depicted.
doi:10.1371/journal.pone.0013164.g002

Cell morphology

Muscle cells were prevalent in the control C1 and patients P1 and P2 cultures as assessed by immunostaining for desmin, a muscle-specific intermediate filament protein. As shown in

Figure 3, at day 7 post-differentiation, most of the Hoescht-stained nuclei are observed in desmin-labeled cells. Noteworthy, in cultures from patient P1, unfused mononucleated myoblasts were abundant, whereas in control C1 and patient P2, myotubes

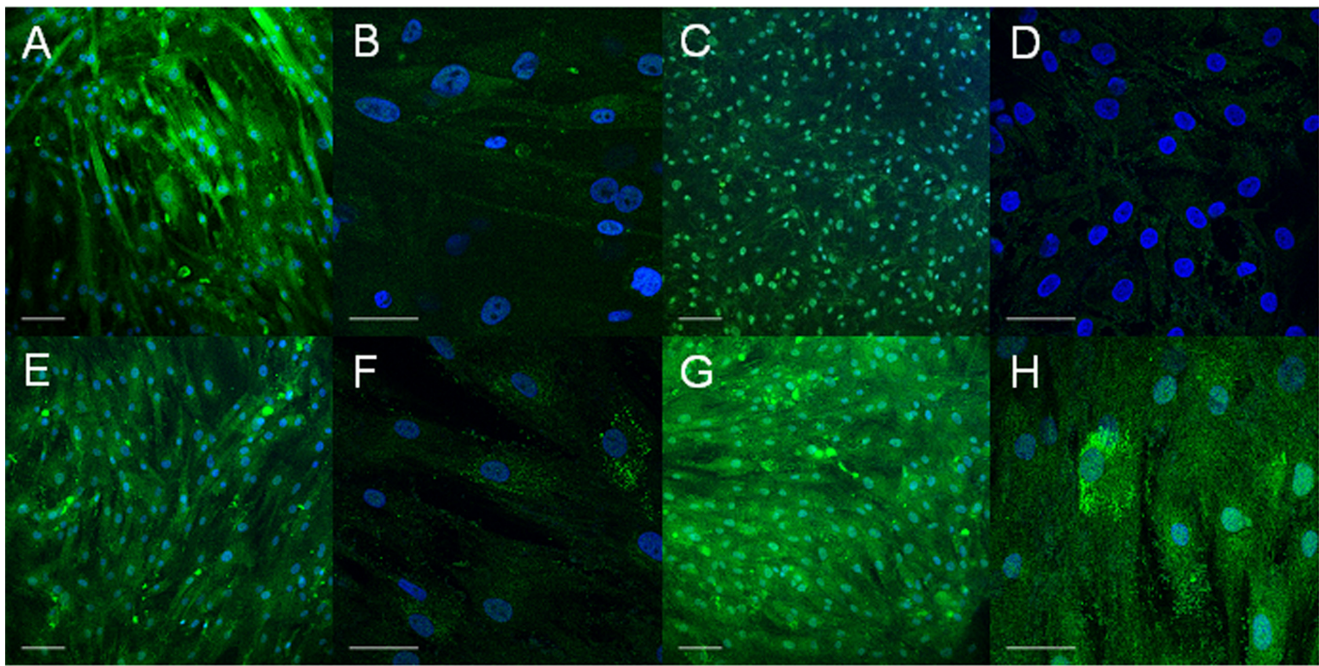


Figure 3. Immunostaining of myotube cultures with the muscle-specific marker desmin. Myotubes at 7 days post-differentiation were immunostained with desmin antibody and then cell nuclei were stained with Hoechst. Representative immunofluorescence micrographs of skeletal muscle cultures are shown: (A,B,E,F) C1, (C,D) P1 and (G,H) P2. In A, C, E and G white bars represent 100 μ m. In B, D, F and H white bars represent 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0013164.g003

prevailed. Cell morphology was similar at day 12 post-differentiation, although muscle cells appeared less delineated in the three cell cultures (data not shown).

Enzyme activities and glycogen content in the cell cultures

We performed biochemical analyses of the cell cultures after 7 days of differentiation. No differences were found when comparing the total activity of GP (controls 136 ± 8 munits/mg of protein and patients 121 ± 12 munits/mg of protein) and GS (controls 22.0 ± 2.5 munits/mg of protein and patients 20.4 ± 1.6 munits/mg of protein) between patients and controls. However, the active forms of GP and GS activities were about 50% lower in the patients' cell cultures with statistical significance being reached ($p < 0.05$). Consequently, the GP and GS activity ratios (active/total) (Figure 4) were also lower in the patients' cell cultures. The amount of glycogen in the patients' cell lines was not significantly different from that of control lines, although they had a tendency to a lower glycogen concentration (Figure 4). Electron microscopic evaluation of glycogen stores (Figure 5) showed that cells from patient P1 had a significantly ($p = 2.86 \times 10^{-7}$) lower number of glycogen granules per cell (45.91 ± 11.35) than control C1 cells (153.0 ± 52.42), but slightly larger granules of glycogen (27.19 ± 8.98 nm) than control C1 cells (25.44 ± 9.04 nm) ($p = 0.001$). In both cell types, glycogen granules and small glycogen clusters were scattered through the cytoplasm; additionally glycogen accumulation in large multigranular bodies was observed (not shown).

Immunoblotting analysis in the cell cultures

We determined the content of GP protein isoforms in the cell cultures after 7 days of differentiation (Figure 6). First, the brain/muscle GP protein level was assessed with an antibody that besides

the brain GP protein recognizes the muscle GP protein when overexpressed in cultured myotubes [28]. We observed about 50% lower levels of brain/muscle GP isoforms relative to α -actin protein in the patients' lines. No signal was however detected when a muscle GP specific antibody was used (data not shown), likely due to the very low gene expression levels, as previously observed [28]. No statistically significant differences were detected when using brain GP or liver GP specific antibodies relative to α -actin protein, in either controls' or patients' cells, although a tendency to increase was observed in patient's cells. We found no significant differences in muscle GS protein content with a rising tendency in patient's cells also.

Discussion

Allelic heterogeneity is a characteristic of *PYGM* genotypes in McArdle patients, as many mutations are only found in a single patient or in the members of the same family. Here, we have identified the mutation *p.R771PfsX33* in homozygosity in two brothers with McArdle's disease. This mutation alters the open reading frame and generates a premature stop codon, which predicts the loss of the final 72 amino acids of the C-terminal domain. These include codons 824 and 825, strongly conserved in 14 GP enzymes from different species [1]. Other mutations generating premature stop codons near codon 771 have been reported to cause McArdle's disease: *p.E779delE*, found in a Korean patient [29], and *p.C784X* [22] and *p.E797VfsX18* [30], both described in Spanish patients. The new mutation reported here should be added to the long list of pathogenic variations described in the *PYGM* gene.

We recently demonstrated absence of *PYGM* transcripts in the skeletal muscle of patients carrying nonsense and frameshift mutations, most likely due to mRNA degradation induced by NMD [12]. This is a critical process for normal cellular

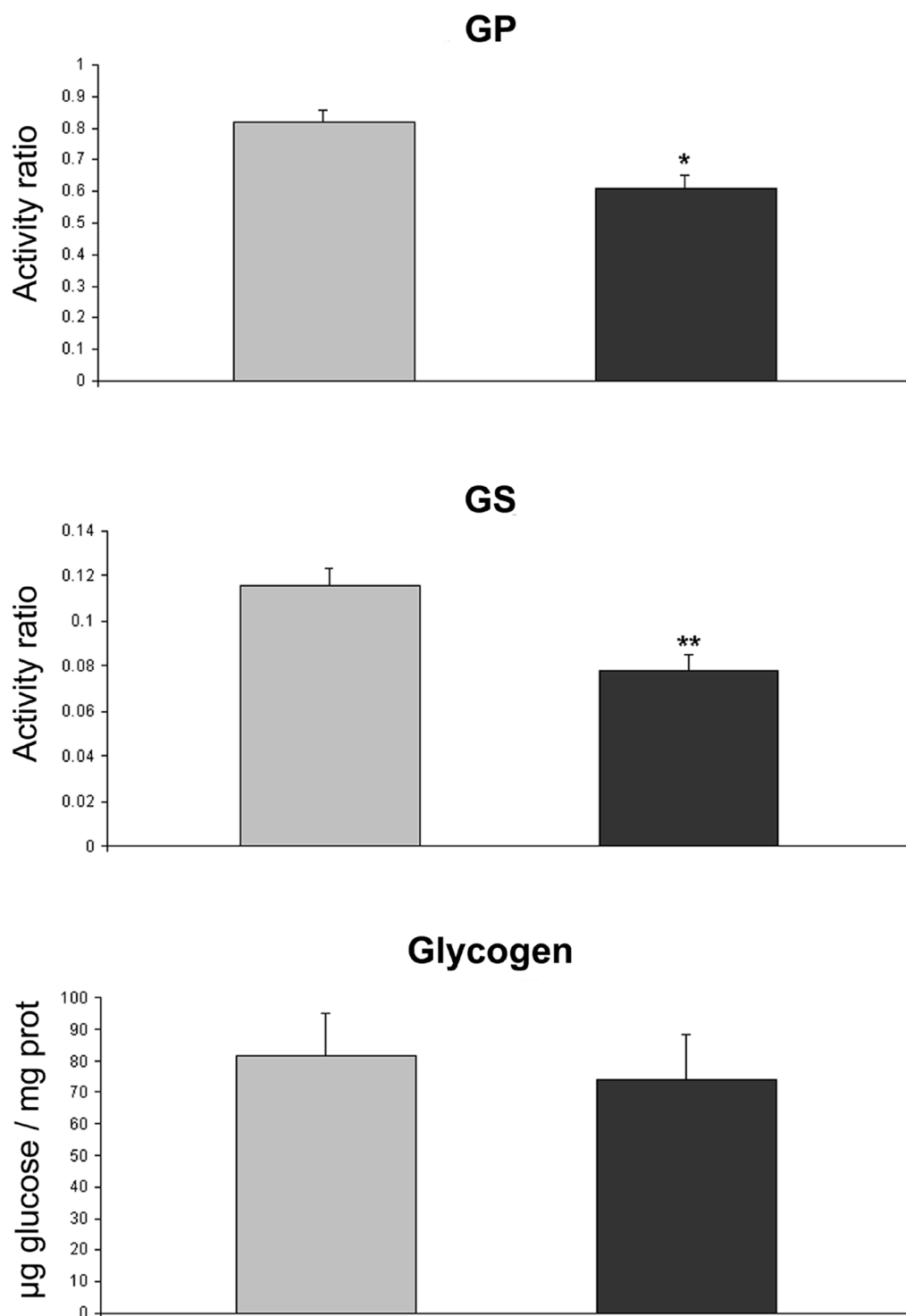


Figure 4. Glycogen phosphorylase activity ratio (active/total), glycogen synthase activity ratio (active/total) and glycogen content. The results represent values for controls (C1, C2) and patients (P1, P2), after 7 days of differentiation. Values are mean \pm SEM. The significance of the difference versus controls is: * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$. Grey bars represent controls and black bars patients. doi:10.1371/journal.pone.0013164.g004

development; it protects the organism from deleterious dominant-negative or gain-of-function effects caused by truncated proteins translated from stable nonsense transcripts [31,32]. Nagy and Maquat [33] originally predicted that any premature termination codon occurring 50 to 55 nucleotides downstream of the 3' most exon-exon junction of a gene would bypass NMD and further

studies showed that mutations located in different exonic regions of the same gene may exhibit different NMD responses [34,35]. Since *p.R771P/X33* fulfils the characteristics to escape NMD, we studied *PYGM* expression. The levels of *PYGM* transcripts in the skeletal muscle of our patients were around 30–40% of those of controls. This reduction is probably due to NMD, yet of a smaller

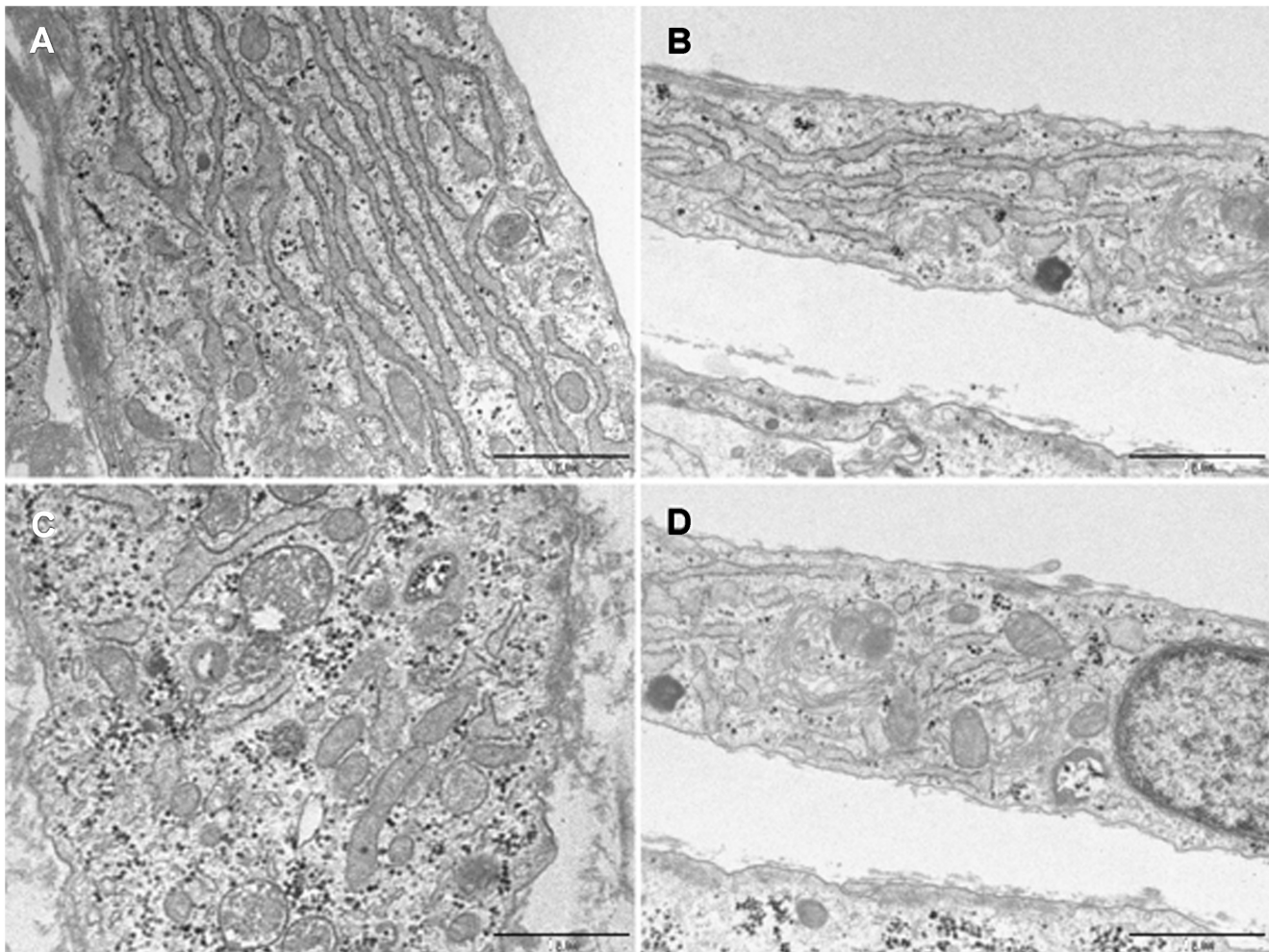


Figure 5. Electron microscopic analysis of glycogen stores. Electron micrograph of myotubes cultured from (A,C) control C1 and (B,D) patient P1, at 10 days post-differentiation. Glycogen granules and clusters appear as black dense particles in the cytoplasm. Bar represents 1 μ m. Images were obtained at x 30,000.

doi:10.1371/journal.pone.0013164.g005

magnitude than previously described for other frameshift and nonsense *PYGM* mutations, in which transcript levels as low as 1–5% were observed [12]. Interestingly, *PYGM* mRNA levels were similar in our two patients, in agreement with our previous findings showing more similar *PYGM* expression levels among related patients as compared to unrelated patients [12]. Thus, some unknown factors irrespective of the type of *PYGM* mutation could also affect the transcription of the gene or the stability of the transcript.

In contrast to the presence of substantial *PYGM* mRNA levels in patients' skeletal muscle, this GP isoform was undetectable by immunoblot in muscle biopsy from P1. This result is consistent with the absence of GP activity in P1 muscle, and might indicate an alteration in the translation of mutant mRNA or changes in the stability of the mutant protein. Translational control is mediated by regulatory proteins or noncoding RNAs that bind to the 3'- or 5'- UTR of target mRNAs [36]. The UTR structures can be missed through disease-causing mutations in coding regions [37], as previously observed [38]. Similarly, *p.R771PfsX33* could be changing the translation regulation of muscle GP in patients bearing this mutation.

Pioneer experimental studies have been performed over the last three decades to obtain and characterize McArdle patients' muscle

and muscle cell cultures [13,14,15,16,17,39]. These studies revealed that cultured muscle cells from McArdle patients have GP activity, even though they are derived from GP-negative muscle tissue. Interestingly, some regenerative fibres from patients also “recover” GP activity together with expression of fetal myosin [17]. Most of these studies were carried out before the *PYGM* gene was discovered and when the number of GP isoenzymes was unknown. This explains, at least partially, the diversity of findings on GP expression in McArdle muscle cell cultures and the lack of reports on possible expression of other isoforms. The development of tools that allow us to distinguish GP mRNA isoforms prompted us to perform *in vitro* studies to characterize the GP gene expression pattern in samples with the *p.R771PfsX33* mutation. We only studied two patients harbouring the same mutation, but we believe that our results are of interest when considering the scarcity of available *in vitro* studies on McArdle's disease.

PYGM mRNA levels dropped drastically in muscle cell culture in all differentiation stages, as compared to those observed in control muscle *in vivo*. In fact, a transcriptome microarray analysis has shown that *PYGM* is among the top downregulated genes in human cultured myotubes compared to skeletal muscle biopsies [23]. In contrast, the *PYGL* messenger was increased in cell culture, while *PYGB* mRNA levels were similar to those observed

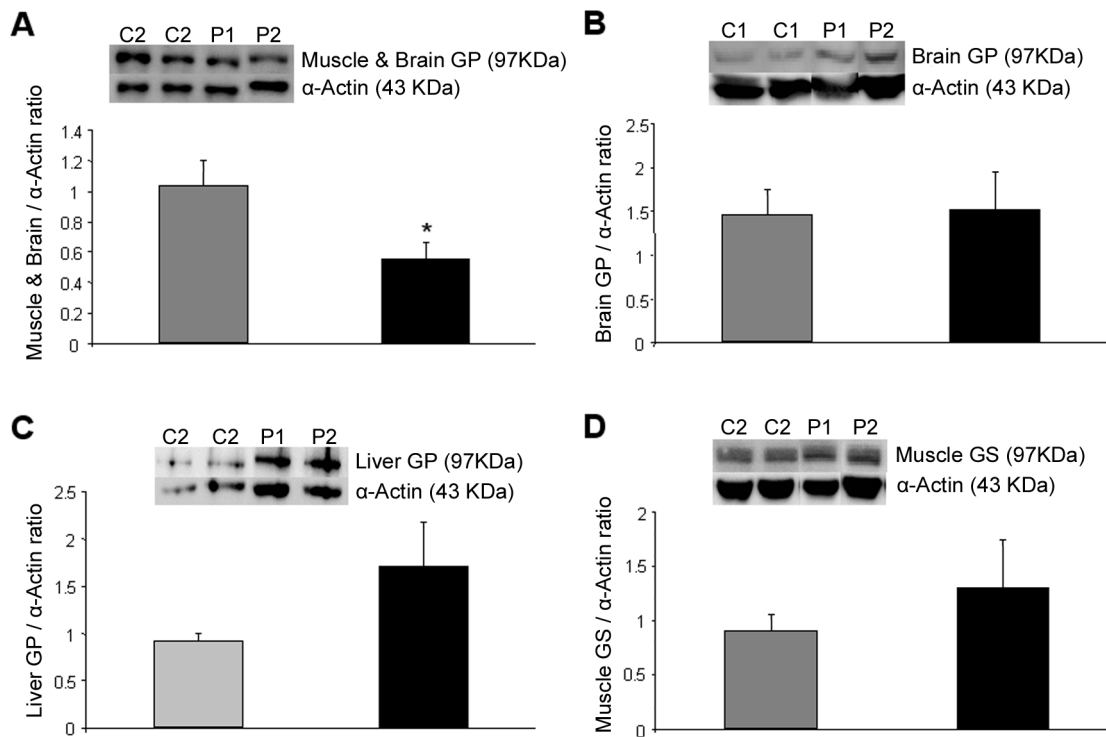


Figure 6. Immunoblotting analysis for brain/muscle GP, brain GP, liver GP and muscle GS proteins, of 7 days differentiated cell lines. Grey bars represent controls (C1, C2) and black bars patients (P1, P2). Anti-actin immunoblotting was performed as loading control. Representative images of brain/muscle GP (A), brain GP (B), liver GP (C) and muscle GS (D) are shown. Ratios of intensity of GP (A, B and C) and GS (D) bands compared to intensity of α -actin bands are shown as mean \pm SEM. The significance of the difference versus controls is * $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0013164.g006

in *in vivo* muscle. Therefore, the muscular isoenzyme is the only form that becomes strongly reduced in cell culture, and this accounts for the strong reduction of GP activity in muscle cultured cells as compared to muscle tissue previously reported [14,16]. Additionally, the pattern of GP isoforms gene expression changes in muscle cell cultures along differentiation. This should be taken into account when cellular models are used for molecular and biochemical studies in McArdle's disease. In this regard, using microarray transcriptional analysis we have previously characterized time-dependent changes in the gene expression profile of cultured human myotubes mostly affecting contractile and apoptosis-related genes [40].

Immunoblotting experiments did reflect: (i) lower content of the brain/muscle GP protein in patients' than controls' muscle cultures, (ii) no significant differences but a tendency to increase when using the specific brain or liver GP antibodies, and (iii) no signal with the muscle GP-specific antibody in both cultured cell types, probably because the GP muscle isoform was below detection level. These data suggest that most of the protein we detected with the brain/muscle GP antibody corresponded to the brain isoform, although the lower brain/muscle protein content in patients may be due to the lack of normal muscle GP protein, as it occurs in muscle biopsies. Enzyme activity measurements revealed lower levels of the active form of GP activity and GP activity ratio, in patients' cell cultures compared to controls. Nevertheless, total GP activity was similar in both cell types, in agreement with previous reports [14,16,39]. GP isoenzymes exhibit differential regulatory features [41,42]. Our data suggest that the lower levels of active GP in patients' cell cultures are not due to the liver isoenzyme: reduced liver isoenzyme, which is poorly activated by AMP, would be expected to cause similar decreases in the GP

activity measured without AMP (active) or with AMP (total). This is not the case: total GP activity levels were comparable between patients' and controls' cultures. Consequently, the reduction should be due to lower AMP-sensitive muscle or brain GP isoenzyme activities. In summary, immunoblotting and enzyme activity data suggest that the reduction in GP protein and activity in patient's cultures corresponds to the muscle GP protein isoform.

With regard to the counterpart enzyme in glycogen metabolism, patients' cells showed lower levels of the active form of GS activity and of GS activity ratio, but equivalent total GS activity. Although GS has not been studied before in McArdle patients' cell cultures, previous research performed *in vivo* in the muscle of McArdle patients showed similar findings, i.e. preserved total GS activity levels compared to control subjects, but lower fractional velocity of GS in the basal condition, at the end of an insulin clamp and after exercise [43]. Overall these data suggest that GP does somehow enhance the activation of its opposite counterpart in glycogen metabolism. In this way, the lack of GP may, as a compensatory mechanism, contribute to inactivate GS and prevent glycogen overload in McArdle patients. In line with this hypothesis, in the patients' cultures, glycogen content compared to healthy controls' cultures was similar with a tendency to lower levels, as assessed by glycogen quantification in cell extracts, and lower number of glycogen granules with slightly larger diameter, as observed by electron microscopy. It should be considered that the smaller difference observed by quantification of glucose following the isolation and the hydrolysis of muscle cell glycogen may be due to variations in branch density [44] or glucose contamination [45] of glycogen or other factors that may affect this technique. Previous research showed similar glycogen content in McArdle and control muscle cultures [14]. *In vitro* data are in contrast to the *in vivo*

findings of abnormal accumulation of glycogen. We hypothesize that *in vivo*, the much larger fall in GP activity in patient's muscle is likely undercompensated by GS inactivation. More research is necessary to clarify the GP mechanism of action and metabolic adaptations that McArdle cultures undergo in the *in vitro* condition.

No effective gene therapy is expected to be available in the foreseeable future to replace skeletal muscle GP [6]. Thus, a deeper knowledge of the regulation and the expression of the different GP isoforms is necessary, as it could contribute to the development of new therapeutic approaches for McArdle's disease. The re-expression of *PYGB* or *PYGL* in skeletal muscle could restore GP activity in this tissue. The "proof-of-principle" of such a strategy has been demonstrated by the ability of utrophin to compensate for the deficiency of dystrophin in the dystrophin-deficient mouse muscle [46], and by the ability of ϵ -sarcoglycan to compensate for the lack of α -sarcoglycan in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy type-2D [47]. Because distinct GP isoforms are naturally produced by different tissues within the same patient, no rejection related problems are to be expected with this type of 're-expression' therapy. Some problems could nevertheless arise from the fact that GP isoenzymes can differ in their regulatory properties and physiological role. Liver GP is activated in hepatocytes to maintain glucose homeostasis in the whole body, brain GP is activated in cases of cerebral anoxia and low glucose availability, whereas muscle GP functions as a glucose supplier only in working skeletal muscle fibers.

References

- Hudson JW, Golding GB, Crerar MM (1993) Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol* 234: 700–721.
- Newgard CB, Littman DR, van Genderen C, Smith M, Fletterick RJ (1988) Human brain glycogen phosphorylase. Cloning, sequence analysis, chromosomal mapping, tissue expression, and comparison with the human liver and muscle isozymes. *J Biol Chem* 263: 3850–3857.
- Mommaerts WF, Illingworth B, Pearson CM, Guillory RJ, Seraydarian K (1959) A Functional Disorder of Muscle Associated with the Absence of Phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45: 791–797.
- Schmid R, Mahler R (1959) Chronic progressive myopathy with myoglobinuria: demonstration of a glycogenolytic defect in the muscle. *J Clin Invest* 38: 2044–2058.
- McArdle B (1951) Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci* 10: 13–33.
- Lucia A, Nogales-Gadea G, Perez M, Martin MA, Andreu AL, et al. (2008) McArdle disease: what do neurologists need to know? *Nat Clin Pract Neurol* 4: 568–577.
- Tsujino S, Shanske S, DiMauro S (1993) Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *N Engl J Med* 329: 241–245.
- Bartram C, Edwards RH, Clague J, Beynon RJ (1993) McArdle's disease: a nonsense mutation in exon 1 of the muscle glycogen phosphorylase gene explains some but not all cases. *Hum Mol Genet* 2: 1291–1293.
- Nogales-Gadea G, Arenas J, Andreu AL (2007) Molecular genetics of McArdle's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7: 84–92.
- Garcia-Consuegra I, Rubio JC, Nogales-Gadea G, Bautista J, Jimenez S, et al. (2009) Novel mutations in patients with McArdle disease by analysis of skeletal muscle mRNA. *J Med Genet* 46: 198–202.
- Frischmeyer PA, Dietz HC (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8: 1893–1900.
- Nogales-Gadea G, Rubio JC, Fernandez-Cadenas I, Garcia-Consuegra I, Lucia A, et al. (2008) Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mutat* 29: 277–283.
- Martinuzzi A, Vergani L, Carrozzo R, Fanin M, Bartoloni L, et al. (1993) Expression of muscle-type phosphorylase in innervated and aneural cultured muscle of patients with myophosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 92: 1774–1780.
- Meienhofer MC, Askanas V, Proux-Daegelen D, Dreyfus JC, Engel WK (1977) Muscle-type phosphorylase activity present in muscle cells cultured from three patients with myophosphorylase deficiency. *Arch Neurol* 34: 779–781.
- DiMauro S, Arnold S, Miranda A, Rowland LP (1978) McArdle disease: the mystery of reappearing phosphorylase activity in muscle culture—a fetal isoenzyme. *Ann Neurol* 3: 60–66.
- Sato K, Imai F, Hatayama I, Roelofs RI (1977) Characterization of glycogen phosphorylase isoenzymes present in cultured skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 78: 663–668.
- Martinuzzi A, Schievano G, Nascimbeni A, Fanin M (1999) McArdle's disease. The unsolved mystery of the reappearing enzyme. *Am J Pathol* 154: 1893–1897.
- DiMauro S, Arnold S, Miranda A, Rowland LP (1977) McArdle disease: the mysterious appearance of phosphorylase activity in cells that ought to lack the genetic program. A fetal isoenzyme? *Trans Am Neurol Assoc* 102: 112–115.
- Haller RG, Vissing J (2002) Spontaneous "second wind" and glucose-induced second "second wind" in McArdle disease: oxidative mechanisms. *Arch Neurol* 59: 1395–1402.
- Mate-Munoz JL, Moran M, Perez M, Chamorro-Vina C, Gomez-Gallego F, et al. (2007) Favorable responses to acute and chronic exercise in McArdle patients. *Clin J Sport Med* 17: 297–303.
- Kubisch C, Wicklein EM, Jentsch TJ (1998) Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum Mutat* 12: 27–32.
- Rubio JC, Garcia-Consuegra I, Nogales-Gadea G, Blazquez A, Cabello A, et al. (2007) A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum Mutat* 28: 203–204.
- Raymond F, Metairon S, Kussmann M, Colomer J, Nascimento A, et al. (2010) Comparative gene expression profiling between human cultured myotubes and skeletal muscle tissue. *BMC Genomics* 11: 125.
- DiMauro S, Hartwig GB, Hays A, Eastwood AB, Franco R, et al. (1979) Debrancher deficiency: neuromuscular disorder in 5 adults. *Ann Neurol* 5: 422–436.
- Gilboe DP, Larson KL, Nuttall FQ (1972) Radioactive method for the assay of glycogen phosphorylases. *Anal Biochem* 47: 20–27.
- Thomas JA, Schlender KK, Larner J (1968) A rapid filter paper assay for UDP-glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal Biochem* 25: 486–499.
- Montori-Grau M, Guitart M, Lerin C, Andreu AL, Newgard CB, et al. (2007) Expression and glycogenic effect of glycogen-targeting protein phosphatase 1 regulatory subunit GL in cultured human muscle. *Biochem J* 405: 107–113.
- Montori-Grau M, Minor R, Lerin C, Allard J, Garcia-Martinez C, et al. (2009) Effects of aging and calorie restriction on rat skeletal muscle glycogen synthase and glycogen phosphorylase. *Exp Gerontol* 44: 426–433.
- Sohn EH, Kim HS, Lee AY, Fukuda T, Sugie H, et al. (2008) A novel PYGM mutation in a Korean patient with McArdle disease: The role of nonsense-mediated mRNA decay. *Neuromuscul Disord* 18: 886–889.
- Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Vilchez J, Cabello A, et al. (2000) Two homozygous mutations (R193W and 794/795 delAA) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Hum Mutat* 15: 294.
- Leeds P, Peltz SW, Jacobson A, Culbertson MR (1991) The product of the yeast *UPF1* gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 5: 2303–2314.
- Kinniburgh AJ, Maquat LE, Schedl T, Rachmilewitz E, Ross J (1982) mRNA-deficient beta o-thalassemia results from a single nucleotide deletion. *Nucleic Acids Res* 10: 5421–5427.

Acknowledgments

We would like to thank Michael Terry for his English language assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GNG EM JA MM AL AGF RM ALA. Performed the experiments: GNG EM IGC JCR AO. Analyzed the data: GNG EM RM ALA. Contributed reagents/materials/analysis tools: AL. Wrote the paper: GNG EM MM AL AGF RM ALA.

33. Nagy E, Maquat LE (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23: 198–199.
34. Luaili S, Di Rocco M, Corsolini F, Spada M, Bembi B, et al. (2006) Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsense-mediated and nonstop decay mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1762: 478–484.
35. Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002) The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 11: 2805–2814.
36. Holcik M, Pestova TV (2007) Translation mechanism and regulation: old players, new concepts. Meeting on translational control and non-coding RNA. *EMBO Rep* 8: 639–643.
37. Scheper GC, van der Knaap MS, Proud CG (2007) Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet* 8: 711–723.
38. Thomson AM, Cahill CM, Cho HH, Kassachau KD, Epis MR, et al. (2005) The acute box cis-element in human heavy ferritin mRNA 5'-untranslated region is a unique translation enhancer that binds poly(C)-binding proteins. *J Biol Chem* 280: 30032–30045.
39. Roelofs RI, Engel WK, Chauvin PB (1972) Histochemical phosphorylase activity in regenerating muscle fibers from myophosphorylase-deficient patients. *Science* 177: 795–797.
40. Ferrer-Martinez A, Montell E, Montori-Grau M, Garcia-Martinez C, Gomez-Foix AM, et al. (2006) Long-term cultured human myotubes decrease contractile gene expression and regulate apoptosis-related genes. *Gene* 384: 145–153.
41. Crerar MM, Karlsson O, Fletterick RJ, Hwang PK (1995) Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation. *J Biol Chem* 270: 13748–13756.
42. Buchbinder JL, Rath VL, Fletterick RJ (2001) Structural relationships among regulated and unregulated phosphorylases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 191–209.
43. Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N, et al. (2002) Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1267–E1275.
44. Pazur JH, Ando T (1960) The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with alpha-D-(1-4) and alpha-D-(1-6) bonds by fungal amyloglucosidase. *J Biol Chem* 235: 297–302.
45. Nunes PM, Carvalho E, Jones JG (2008) Elimination of glucose contamination from adipocyte glycogen extracts. *Carbohydr Res* 343: 1486–1489.
46. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, et al. (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4: 1441–1444.
47. Imamura M, Mochizuki Y, Engvall E, Takeda S (2005) Epsilon-sarcoglycan compensates for lack of alpha-sarcoglycan in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 14: 775–783.

**TITLE: A TRANSCRIPTOMIC APPROACH TO SEARCH FOR NOVEL
PHENOTYPIC REGULATORS IN McARDLE DISEASE.**

RUNNING HEAD: Transcriptomic profile of McArdle disease

AUTHORSHIP Gisela Nogales-Gadea, PhD,^{1,2,4} Inés Consuegra-García, MSc,^{4,6} Juan C. Rubio, PhD,^{4,7} Joaquin Arenas, MD, PhD,³ Marc Cuadros, MSc,^{1,4} Yolanda Camara, PhD,^{1,4} Javier Torres-Torronteras, PhD,^{1,4} Carmen Fiuza-Luces, MSc,⁵ Alejandro Lucia, MD, PhD,⁵ Miguel A. Martín, PhD,^{3,4} Elena García-Arumí, PhD,^{1,4} Antoni L. Andreu, MD, PhD^{1,4}

¹Departament de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

² Experimental Neurology Laboratory, Institut de Recerca HSCSP, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁴Spanish Network for Research in Rare diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain

⁵Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

⁶Unidad de Proteómica, Instituto de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁷Unidad de Genómica, Instituto de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

CORRESPONDING AUTHOR INFORMATION: Correspondence to Elena García Arumí, Laboratori de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail: e.garcia@vhebron.net

ABSTRACT

McArdle disease is caused by lack of glycogen phosphorylase (GP) activity in skeletal muscle. Patients experience exercise intolerance, presenting as early fatigue and contractures. In this study, we investigated the effects produced by a lack of GP on several genes and proteins of skeletal muscle in McArdle patients. Muscle tissue of 35 patients and 7 healthy controls were used to identify abnormalities in the patients' transcriptomic profile using low-density arrays. Gene expression was analyzed for the influence of variables such as sex and clinical severity. Differences in protein expression were studied by immunoblotting and 2D analysis, and protein complexes were examined by two-dimensional, blue native gel electrophoresis (BN-PAGE). A number of genes including those encoding acetyl-coA carboxylase beta, m-cadherin, calpain III, creatine kinase, glycogen synthase (GS), and sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (SERCA1), were downregulated in patients. Particularly, compared to controls GS and SERCA1 proteins were reduced by 50% and 75% respectively; also, unphosphorylated GS and

SERCA1 were highly down-regulated. On BN-PAGE analysis, GP was present with GS in two muscle protein complexes. Our findings revealed some issues that could be important in understanding the physiological consequences of McArdle disease: (i) SERCA1 downregulation in patients could result in impaired calcium transport in type II (fast-twitch) muscle fibers, leading to early fatigability during exercise tasks involving type II fibers (which mostly use glycolytic metabolism), i.e. isometric exercise, lifting weights or intense dynamic exercise (stair climbing, bicycling, walking at very brisk pace), (ii) GP and GS were found together in two protein complexes, which suggests a new regulatory mechanism in the activity of these glycogen enzymes.

INTRODUCTION

McArdle disease (glycogen storage disease type V) is an autosomal recessive disorder caused by a deficiency of muscle glycogen phosphorylase (GP), the enzyme that catalyzes the first step in glycogen catabolism.[1,2] Because of this deficiency, daily life activities involving isometric exercise (e.g. lifting weights) or dynamic exercise (e.g. stair climbing) trigger exercise intolerance in McArdle patients, which manifests as early fatigue and contractures, sometimes accompanied by rhabdomyolysis and myoglobinuria.[3] Any muscle in the body can be affected and approximately one-third of patients also develop proximal muscle fixed weakness and wasting with aging. [4,5]

The rationale for exercise intolerance in these patients has been traditionally explained through metabolic depletion. Blockade of glycogen breakdown compromises aerobic and anaerobic glycolysis.[6] The oxidative capacity of the patients' muscle is also impaired because their ability to produce pyruvate - a molecule that plays an anaplerotic role in the Krebs cycle - is severely reduced [3]. Nonetheless, it is also of note that the extent of the oxidative defect is substrate dependent; i.e., it can be partially corrected by increasing the availability of alternative oxidative substrates (e.g. glucose) to working muscles [7]. The reduced potential for oxidative phosphorylation is reflected by marked reduction in the ($[ATP]/[ADP][Pi]$) ratio during muscle contractions compared with healthy controls (as shown with phosphorus magnetic resonance spectroscopy) [8]. With regards to this, the premature muscle fatigue and cramping of McArdle patients is associated with an increased accumulation of Pi and probably ADP in skeletal muscle;

accumulations of Pi and ADP are indeed known to inhibit (i) myofibrillar, (ii) sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} , and (iii) membrane Na^+ - K^+ -ATPase reactions [9].

On the other hand, an additional hallmark of the disorder, which is not necessarily related with exercise intolerance is the chronic high subsarcolemmal and intermyofibrillar glycogen stores deposits that are present in patients' muscles.[10,11,12]. Glycogen synthesis is catalyzed by the enzyme, glycogen synthase (GS), which exerts the opposite function of GP. Both enzymes share regulatory mechanisms: covalent modification, allosteric activation, and enzymatic translocation.[13] The role of GS in glycogen accumulation is not fully understood, and a decrease in GS activity has been reported in McArdle patients.[14,15] The activity of enzymes regulating covalent modification of GS, glycogen synthase kinase and protein phosphatase 1, do not explain the reduction in GS activity present in the patients.[15]

In this study, we characterized the transcriptomic profile of a selection of key genes involved in the maintenance of skeletal muscle function. We identified other chronic protein alterations that occur in the muscle of McArdle patients in addition to GP deficiency: (i) a near absence of the unphosphorylated SERCA1; and (ii) a reduction of GS, with a shift through the inactive forms of both proteins. Furthermore, protein studies suggested that GP binds with GS to form protein complexes, thereby creating an additional mechanism to regulate glycogen metabolism.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

35 Spanish McArdle patients (P1-P35), some of them previously characterized by molecular techniques [14,15,16,17] were included in the study (Table 1). To avoid differences due to lower muscle training compared with non-patients, 7 healthy volunteers with sedentary life-style habits were used as controls (C1-C7). Age range was 17 to 71 years in the patient group and 23 to 50 years in the control group. Patients presented a broad representation of the different clinical severity groups, in accordance with a previously reported scale by Martinuzzi et al.[18]. Patients P1-P34 and controls C1-C5 were studied in the RNA analysis. Later, patient P35, and controls C6 and C7

were included in the studies of 2D and blue native gel electrophoresis, due to the high amount of protein needed for these analyses. Written consent was obtained from all participants. The study was approved by the Ethics Committee of *Hospital Universitario 12 de Octubre* and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research. A skeletal muscle biopsy was obtained from patients and controls.

Low Density Array (LDA) and Real-Time PCR analysis

RNA samples were obtained as previously described.[14] Customized low-density arrays (LDAs) were configured to study 48 genes (see Supplementary Table 1) using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The genes we studied play an important role in major muscle functions: metabolism, membrane transport, mitochondrial function/biogenesis and dynamics, maintenance of cytoskeleton, contractile function, calcium reuptake in sarcoplasmic reticulum, control of muscle growth, atrophy and differentiation, neuromuscular transmission, anti-stress protection, inflammation and cell death.

Samples were run in duplicate on the ABI 7900HT system (Applied Biosystems). The PCR conditions were 2 min at 50 °C and 10 min at 94.5 °C, followed by 50 cycles of two steps, 30-s at 97 °C and 1 min at 59.7 °C. Cyclophilin A (*PPIA*) was used as the housekeeping gene, the calibrator sample was C2, and the software for the analysis was SDS 2.3 and RQ 1.2 (Applied biosystems). The muscle GP (*PYGM*) (Hs00194493_m1) and leptin (*LEP*) (Hs00174877_m1) genes were quantified by real-time PCR using TaqMan fluorogenic probes, as described elsewhere.[14]

Immunoblot Analysis

Skeletal muscle specimens were homogenized in 40 mM β -glycerophosphate, 40 mM NaF, 10 mM EDTA, and 20 mM mercaptoethanol (pH 6.8). Proteins were resolved on 10% SDS polyacrylamide gel. Antibodies against SERCA1, calpain 3, muscle cadherin (m-cadherin) (Abcam, Cambridge, UK), muscle GS (Cell signaling, Danvers, USA), and muscle GP (primary antibody generated in Dr. Martinuzzi's laboratory) were utilized. The horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies included goat anti-mouse, goat anti-rabbit (Jackson Laboratories, PA, USA), and donkey anti-goat (Santa Cruz,

Santa Cruz, CA, USA). Membranes were developed with ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK). Images were obtained with an LAS-3000 system (FujiFilm, Tokyo, Japan) and quantified with NIH image J (version 1.37) software (Scion image, NIH). Cyclophilin A (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA) was used as the housekeeping protein.

2D Analysis

Skeletal muscle was homogenized in lysis buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL pepstatin A, and 0.5 mM PMSF). Seventy micrograms of protein were applied by cup loading and focused using the IPGphor 3 electrophoresis unit (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). For the second dimension, IPG strips were reduced for 15 min in SDS-equilibration buffer (6 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20% glycerol, 10% SDS, 1% w/v DTT, and a trace of bromophenol blue); proteins were then alkylated in the same buffer containing 2.5% w/v iodoacetamide. Second dimension separation was performed on 10% gel. The same primary antibodies were used, with the exception of muscle GP (Abcam, Cambridge, UK); α -tubulin (Sigma, Saint Louis, USA) was used as the housekeeping protein.

Blue Native Gel Electrophoresis (BN-PAGE)

BN-PAGE [19] was performed with 3% to 12% polyacrylamide gradient gels. Proteins were extracted with 1% *n*-dodecyl- β -D-maltoside and diluted with a buffer containing 1.5 M aminocaproic acid, 2 mM EDTA, and 50 mM bis-Tris (pH 7.0). Serva Blue G was added to solubilize proteins to a final concentration of 0.01 mg/ mg protein and 50 µg of protein were loaded into each lane. Denatured proteins were resolved in a second dimension and the following steps were the same as those used in 2D analysis.

Statistical analysis

Differences in LDA gene expression were evaluated with a permutation analysis and *p*-values were adjusted for multiple comparisons using the False Discovery Rate control method.[20] The influence of other variables on gene expression was tested. Each gene was adjusted to different linear models and all possible variable combinations were tested. The model for qualitative variables (sex, muscle biopsy, Martinuzzi index) was equivalent to analysis of variance, and the model for numeric and quantitative variables (age, amount of *PYGM* and *LEP* transcripts) was equivalent to analysis of covariance.

The statistical analysis for immunoblotting was performed using SPSS (SPSS15.0, Chicago, IL, USA). Differences between groups were analyzed with the non-parametric Mann Whitney *U* test.

RESULTS

Expression of ACACB, CAPN3, CADH15, CKMM, GYS1 and SERCA1 is down-regulated in McArdle patients

Expression analysis were done in 34 patients (P1-P34) and 5 healthy individuals (C1-C5) (17 women and 22 men). Statistically significant differences between patients and controls ($p < 0.01$) were observed in 6 of the genes studied (Figure 1A-1F): *ACACB*, *CAPN3*, *CADH15*, *CKMM*, *GYS1* and *SERCA1*. Patients presented a lower amount of transcripts than controls, for all of the 6 aforementioned genes. Additionally, 10 genes showed significantly decreased expression in patients compared with controls ($p < 0.05$) (Supplementary Table2).

The individuals included in the study group showed considerable heterogeneity for certain characteristics (Table 1). Therefore, the data were reanalyzed to exclude these factors as the cause of the differential gene expression, and no associations were identified for sex, age, and muscle type. *PYGM* genotype was analyzed by classifying the patients in three groups: (i) two missense mutations, (ii) one missense mutation and one nonsense mutation, or (iii) two nonsense mutations. The expression profile of these genes was not influenced by the patients' *PYGM* genotype. In addition, to determine whether the amount of adipose tissue in skeletal muscle could influence the gene expression pattern, leptin (*LEP*) expression [21] was studied, and no differences in content of *LEP* transcripts was found. This lack of correlations, suggest that the differences in the expression pattern was solely due to the existence of the enzyme (GP) deficiency.

SERCA1 and muscle GS protein content were reduced in patients

We studied in 4 patients (P21, P30, P32 and P34) and 3 controls (C2, C3, and C4) the protein products of four genes whose transcripts were altered. These included *SERCA1*, *GYS1*, *CAPN3* and *CADH15*. Two of these proteins showed lower levels in patients

compared with controls, i.e. SERCA1 and glycogen synthase (GS), with 75% and 50% lower values in patients respectively ($p < 0.05$) (Figure 2). The upper GS band, corresponding to its expected weight of 94 KDa, was even more markedly decreased, with a 72% reduction in patients. In addition, some lower GS bands appeared, suggesting changes in the protein phosphorylation rate.

Patients presented reduced unphosphorylated muscle GS and a near absence of unphosphorylated SERCA1

As in the immunoblot study, 2D gel analysis showed an absence of muscle GP in patients (Figure 3). For muscle GS, two clear spots appeared (thin arrows), but the patients showed higher amounts of acidic muscle GS (continuous thin arrow), which corresponds to phosphorylated forms of muscle GS, whereas the controls showed a higher amount of more basic muscle GS (discontinuous thin arrow), corresponding to unphosphorylated forms. Compared to the controls, patients showed a 20% reduction in unphosphorylated GS and a 60% increase in phosphorylated GS. Similarly, SERCA1 protein presented as two differentiated spots, but the spot for basic (unphosphorylated) SERCA1 was almost absent (thick arrow) in patients.

GP formed two protein complexes with GS, which were lower in McArdle patients

BN-PAGE (Figure 4A) showed 2 spots (continuous arrows) for muscle GP: a spot corresponding to a complex running in a medium acrylamide concentration, and a spot corresponding to a second complex, in a lower acrylamide concentration. When the membranes were hybridized against SERCA1, no overlapping with muscle GP was seen, suggesting no interaction of SERCA1. However, when muscle GS was tested in the membranes, two of the three complexes detected for this enzyme overlapped with the two previously found for muscle GP (discontinuous arrows), suggesting that both are present in these complexes. In patients P29 and P35, no signal was detected for muscle GP in comparison with the control (C7) (data not shown). When testing for muscle GS complexes in patients, the same complexes were present as in controls, but the two complexes in which muscle GP was absent showed a 70% reduction of muscle GS (Figure 4B).

DISCUSSION

This study shows the power of transcriptomic arrays combined with proteomic analysis to identify proteins involved in the pathophysiology of metabolic disorders of skeletal muscle. As the amount of sample required for protein studies is higher than for RNA studies, we selected the most significant 16 genes whose transcripts were found to be significantly lower compared with controls. We further studied two of these genes (*SERCA1* and *GYS1*) at the protein level due to their key role in muscle function.

Skeletal muscle is the major site of insulin-stimulated glucose uptake, and most of this glucose is stored as glycogen through GS activity.[22] Evidence of deregulation in this pathway has been reported in McArdle patients, who have decreased insulin action in skeletal muscle compared with healthy controls after a hyperinsulinemic clamp, resulting in lower glucose use and lower GS activity.[11] McArdle patients also been shown to have low GS activity during exercise [12]. Immunoblotting results (see Figure 2) are similar to those of a previous study with McArdle patients a decrease in GS protein compared with healthy controls [11]. We also could identify several bands that represent different phosphorylated forms of the enzyme. GS has 9 residues that can be phosphorylated, causing progressive inactivation of the enzyme.[22] With the use of 2D gels, we showed that, compared with controls, patients had an increase of inactive GS and a decrease of active forms. Some authors have shown that high glycogen in skeletal muscle causes lower insulin-stimulated glycogen synthesis and glycogen synthase activation [23]. Therefore the high glycogen accumulation in muscle biopsies of these patients can be one of the contributors to GS inactivation.

BN-PAGE showed that GP forms two complexes in which GS is also present. This is relevant as some alterations in GS activity and phosphorylation occurring in McArdle patients cannot be fully explained by the decrease of enzyme activities responsible for the covalent modification of the enzyme.[12] The other two control mechanisms involved are allosteric regulators and enzyme translocation,[13] but neither explains the low phosphorylation rate of muscle GS in these patients. The presence of muscle GP-GS complexes suggest that their common allosteric regulators and covalent modifiers function better if both proteins are in physical vicinity. For example, the onset of

contraction results in a release of Ca^{2+} stores from the SR, which activates phosphorylase kinase; this in turn, activates GP and inactivates GS, both by phosphorylation. Protein complexes containing these two enzymes are expected to allow more flexible, efficient, and faster coupling between synthesis and degradation of glycogen.[24] The presence of GP in the complex also seems to stimulate GS binding, as evidenced by the fact that McArdle patients presented 30% less GS in comparison with healthy controls.

A decreased rate of Ca^{2+} reuptake by the SR (through SERCA pumps) can cause slowing of relaxation and contribute to decreased muscle force production in fatigued muscles. Indeed, muscle fatigue is usually accompanied by a slowing of relaxation and high rates of glycolytic ATP production, since up to 80% of the ATP consumed during contraction is required for optimum muscle relaxation [25,26]. Thus, the decrease of SERCA1 protein we found in our patients compared with controls is of particular interest. Partial reductions in the activity [27] or total amount of SERCA1 due to *SERCA1* mutations cause a disorder known as Brody myopathy,[30] a rare skeletal muscle condition that shares some common clinical features with McArdle disease, i.e. patients experience progressive muscle stiffness during exercise, leading to cramps.[28] Lack of SERCA1 also causes neonatal death in mice[29] SERCA1 is a Ca^{2+} transporter ATPase located in the SR of fast twitch, type II fibers. Thus, SERCA1 is essential for normal development of contraction-relaxation cycles in these fibers, which are mainly glycogenolytic and therefore more sensitive to GP deficiency. Thus, SERCA1 reduction may preferentially affect those exercise tasks involving type II muscle fibers, i.e. isometric exercise, lifting weights or intense dynamic exercise (stair climbing, running, walking at very brisk pace, bicycling). This hypothesis is indirectly supported by the results of a recent study by our group using electromyography, in which McArdle patients showed excessive fiber recruitment during dynamic (cycle-ergometry) exercise, a phenomenon which was more marked at high intensities.[30] Interestingly, the low SERCA1 levels found in 2D gels in our McArdle patients is similar to that reported for Brody patients,[30] yet McArdle patients showed a preferential reduction in SERCA1 unphosphorylated forms. Cuenda et al[31] found that GP inactive status affects SERCA, producing a shift towards its ATP binding conformation. Additionally, concentrations of calcium, ATP, ADP, and P_i , as well as pH values[32] can modify the phosphorylation rate in SERCA1, and some of these

factors are reported to be deregulated in McArdle disease, notably increased [ADP] and [Pi]. [4]

The biochemical bases of muscle fatigue in McArdle disease are not fully understood and a reduction in sodium-phosphate ATPases has been described as a possible cause of fatigability in McArdle disease.[33] As mentioned above, SERCA1 downregulation may also participate in the early fatigue that McArdle patients experience during exercise.[3] The reduction in both ATPases could also be related, since a preferential glycogenolytic energy supply and close membrane localization has been proposed to exist between the glycolytic enzymes and these channels.[34] Although SERCA1 is not present in muscle GP complexes, some reports provided evidence that they are located in close proximity. Meyer and coworkers [35] isolated protein-glycogen complexes and found glycogen particles and enzymes related with glycogen metabolism, among them GP, in the light fraction, and elements of the SR characterized by strong ATPase activity in the heavy fraction. Other authors reported the presence of SR in the sarcomeric I band, where glycogen deposits are located, and where glycogen is markedly reduced during muscle activity.[35,38] Moreover, calcium uptake in the SR can be supported solely through enzymatic breakdown of glycogen by GP.[36,37]

In summary, our results suggest that the absence of GP in McArdle patients may result in down-regulation of two control points in the metabolism of skeletal muscles, i.e. (i) SERCA1 protein levels and phosphorylation and (ii) the amount of GS. The main findings of our study are schematized in Figure 5. The muscle of McArdle patients shows a shift towards inactive GS forms, protecting these patients from the occurrence of muscle glycogen overload. Some contributors to GS inactivation can be the deregulation of protein complexes GP-GS and the high glycogen accumulation in skeletal muscle. Overall, this study shows the existence of a link between muscle GP, muscle contraction-relaxation, and glycogen synthesis that may have a primary role in the pathophysiological events of this disorder.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Andrea Martinuzzi, who kindly provided the antibody against skeletal muscle glycogen phosphorylase, and the Unitat d'Estadística and Bioinformàtica from Institut de Recerca Vall d'Hebron for their support in the statistical analysis.

REFERENCES

1. Schmid R, Mahler R (1959) Chronic progressive myopathy with myoglobinuria: demonstration of a glycogenolytic defect in the muscle. *J Clin Invest* 38: 2044-2058.
2. Mommaerts WF, Illingworth B, Pearson CM, Guillory RJ, Seraydarian K (1959) A Functional Disorder of Muscle Associated with the Absence of Phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45: 791-797.
3. Lucia A, Nogales-Gadea G, Perez M, Martin MA, Andreu AL, et al. (2008) McArdle disease: what do neurologists need to know? *Nat Clin Pract Neurol* 4: 568-577.
4. Nadaj-Pakleza AA, Vincitorio CM, Laforet P, Eymard B, Dion E, et al. (2009) Permanent muscle weakness in McArdle disease. *Muscle Nerve* 40: 350-357.
5. DiMauro S, Andreu AL, Bruno C, Hadjigeorgiou GM (2002) Myophosphorylase deficiency (Glycogenosis type V; McArdle Disease). *Current Molecular Medicine* 2: 189-196.
6. Elliot DL, Buist NR, Goldberg L, Kennaway NG, Powell BR, et al. (1989) Metabolic myopathies: evaluation by graded exercise testing. *Medicine (Baltimore)* 68: 163-172.
7. Vissing J, Haller RG (2003) The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease. *N Engl J Med* 349: 2503-2509.
8. Zange J, Grehl T, Disselhorst-Klug C, Rau G, Muller K, et al. (2003) Breakdown of adenine nucleotide pool in fatiguing skeletal muscle in McArdle's disease: a noninvasive ³¹P-MRS and EMG study. *Muscle Nerve* 27: 728-736.
9. Lewis SF, Haller RG (1986) The pathophysiology of McArdle's disease: clues to regulation in exercise and fatigue. *J Appl Physiol* 61: 391-401.
10. Dubowitz V, Sewry CA (2007) *Muscle Biopsy: A Practical Approach: Expert Consult*.
11. Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N, et al. (2002) Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1267-1275.
12. Nielsen JN, Wojtaszewski JF, Haller RG, Hardie DG, Kemp BE, et al. (2002) Role of 5'AMP-activated protein kinase in glycogen synthase activity and glucose utilization: insights from patients with McArdle's disease. *J Physiol* 541: 979-989.
13. Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, Brady MJ (2006) Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E1-8.
14. Nogales-Gadea G, Rubio JC, Fernandez-Cadenas I, Garcia-Consuegra I, Lucia A, et al. (2008) Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mutat* 29: 277-283.
15. Garcia-Consuegra I, Rubio JC, Nogales-Gadea G, Bautista J, Jimenez S, et al. (2009) Novel mutations in patients with McArdle disease by analysis of skeletal muscle mRNA. *J Med Genet* 46: 198-202.

16. Rubio JC, Garcia-Consuegra I, Nogales-Gadea G, Blazquez A, Cabello A, et al. (2007) A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum Mutat* 28: 203-204.
17. Nogales-Gadea G, Mormeneo E, Garcia-Consuegra I, Rubio JC, Orozco A, et al. (2010) Expression of glycogen phosphorylase isoforms in cultured muscle from patients with McArdle's disease carrying the p.R771PfsX33 PYGM mutation. *PLoS One* 5: e13164.
18. Martinuzzi A, Sartori E, Fanin M, Nascimbeni A, Valente L, et al. (2003) Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency. *Ann Neurol* 53: 497-502.
19. Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ (2002) Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26: 327-334.
20. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57: 289-300.
21. Weigle DS, Ganter SL, Kuijper JL, Leonetti DL, Boyko EJ, et al. (1997) Effect of regional fat distribution and Prader-Willi syndrome on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 566-570.
22. Lawrence JC, Jr., Roach PJ (1997) New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* 46: 541-547.
23. Jensen J, Jebens E, Brennesvik EO, Ruzzin J, Soos MA, et al. (2006) Muscle glycogen inharmoniously regulates glycogen synthase activity, glucose uptake, and proximal insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E154-E162.
24. Mutalik VK, Venkatesh KV (2005) Quantification of the glycogen cascade system: the ultrasensitive responses of liver glycogen synthase and muscle phosphorylase are due to distinctive regulatory designs. *Theor Biol Med Model* 2: 19.
25. Allen DG, Lamb GD, Westerblad H (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* 88: 287-332.
26. Dirksen RT (2009) Sarcoplasmic reticulum-mitochondrial through-space coupling in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 34: 389-395.
27. Odermatt A, Taschner PE, Khanna VK, Busch HF, Karpatis G, et al. (1996) Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease. *Nat Genet* 14: 191-194.
28. Odermatt A, Barton K, Khanna VK, Mathieu J, Escolar D, et al. (2000) The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum Genet* 106: 482-491.
29. Pan Y, Zvaritch E, Tupling AR, Rice WJ, de Leon S, et al. (2003) Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice. *J Biol Chem* 278: 13367-13375.
30. Rae DE, Noakes TD, San Juan AF, Perez M, Nogales-Gadea G, et al. (2010) Excessive skeletal muscle recruitment during strenuous exercise in McArdle patients. *Eur J Appl Physiol* 110: 1047-1055.
31. Cuenda A, Centeno F, Gutierrez-Merino C (1991) Modulation by phosphorylation of glycogen phosphorylase-sarcoplasmic reticulum interaction. *FEBS Lett* 283: 273-276.

32. Periasamy M, Kalyanasundaram A (2007) SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35: 430-442.
33. Haller RG, Clausen T, Vissing J (1998) Reduced levels of skeletal muscle Na⁺K⁺ - ATPase in McArdle disease. *Neurology* 50: 37-40.
34. Weiss JN, Lamp ST (1987) Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science* 238: 67-69.
35. Meyer F, Heilmeyer LM, Jr., Haschke RH, Fischer EH (1970) Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. I. Isolation and characterization of the protein-glycogen complex. *J Biol Chem* 245: 6642-6648.
36. Cuenda A, Nogues M, Gutierrez-Merino C, de Meis L (1993) Glycogen phosphorolysis can form a metabolic shuttle to support Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum membranes in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1127-1132.
37. Nogues M, Cuenda A, Henao F, Gutierrez-Merino C (1996) Ca²⁺ uptake coupled to glycogen phosphorolysis in the glycogenolytic-sarcoplasmic reticulum complex from rat skeletal muscle. *Z Naturforsch C* 51: 591-598.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Scatter-plots of the six genes presenting highest differential expression between patients and controls ($p<0.01$). A. Acetyl-CoA carboxylase beta (*ACACB*); B. Calpain III large subunit (*CAPN3*); C. M-cadherin (*CADH15*); D. Muscle creatine kinase (*CKMM*); E. Muscle glycogen synthase (*GYS1*); F. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1 (*SERCA1*). Each subject is represented by a dot.

Figure 2. Immunoblotting of patients and controls for SERCA1, muscle GP, muscle GS, and cyclophilin A proteins. In the upper panel it is shown the immunoblotting for the different proteins and in the lower panel the graphic of densitometry for SERCA1 and muscle GS. Intensity ratios of protein bands to cyclophilin A are shown as mean \pm SD. Symbol : * $p<0.05$; Upper, upper band of muscle GS immunoblotting; Lower, lower band of muscle GS immunoblotting; Patients P21, P30, P32 and P34; Controls C2, C3, C4.

Figure 3. 2D gel analysis of muscle GP, muscle GS, SERCA,1 and α -tubulin in 2 controls and 2 patients. In the first dimension, isoelectric focusing separated proteins by pH 3-11. In the second dimension, proteins were separated by molecular weight. Abbreviations: pI, isoelectric point; MW, molecular weight

Figure 4. BN-PAGE of muscle GP, muscle GS, and SERCA1. A. BN-PAGE for control C4. In the first dimension (1D), acrylamide percentage ranges from 3% to 12%. In the second dimension (2D), continuous arrows indicate the 2 protein complexes in which muscle GP participates. Discontinuous arrows show muscle GS forming complexes with muscle GP. B. Second dimension of muscle GP BN-PAGE in a control (C7) and patients (P29 and P35).

Figure 5. Schematic representation of the main findings and conclusions (in grey squares) of our study with regards to the pathophysiology of McArdle disease. Abbreviations: GS (glycogen synthase), GP [glycogen phosphorylase, muscle isoform (myophosphorylase)], SERCA1 (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1).

Table 1: Demographic data and information obtained by low-density array analysis in patients and healthy controls

Participant number	Sex	Age ^a	Muscle biopsy	GP activity ^b	Genotype ^c	Clinical severity scale ^d
P1	M	59	B	0	p.W798R/p.W798R	3
P2	M	18	NA	0	p.R194W/p.P797VfsX19	2
P3	M	34	NA	0	p.R50X/p.R94W	2
P4	M	19	NA	0	p.R50X/p.G205S	1
P5	M	22	B	0	p.R50X/p.G205S	2
P6	M	17	B	0	p.R50X/p.A660D	1
P7	M	13	B	0	p.R50X/p.W798R	3
P8	M	33	NA	0	p.R50X/p.W798R	0
P9	F	21	B	0	p.N134KfsX161/p.R491AfsX7	3
P10	M	18	Q	0	p.W388SfsX34/p.K754fsX49	2
P11	F	68	NA	0	p.R50X/p.L5vfsX22	0
P12	F	32	B	0	p.R50X/p.L5vfsX22	1
P13	F	63	NA	0	p.R50 X/p.Q73HfsX7	3
P14	F	40	B	0	p.R50X/p.534VfsX5	1
P15	M	NA	B	0	p.R50X/p.534VfsX5	1
P16	M	35	NA	0	p.R50X/p.K754NfsX49	2
P17	F	31	Q	0	p.R50X/p.R50X	2
P18	M	71	Q	0	p.R50X/p.R50X	0
P19	F	21	B	0	p.R50X/p.R50X	3
P20	M	52	NA	0	p.E125X/p.E125X	3
P21	F	56	Q	0	p.W798R/p.W798R	1
P22	F	20	Q	0	p.R50X/p.L354P	0
P23	F	51	Q	0	p.R50X/p.R50X	3
P24	M	51	B	0	p.R50X/PIM	3
P25	M	21	B	0	p.G205S/p.Q176_M177insVQ	2
P26	F	26	Q	10	PIM/PIM	2
P27	M	25	D	0	p. G174D/c.1827G>A	2
P28	M	NA	NA	0	p.R50X/c.1969+214_2177+369del	2
P29	F	47	Q	0	p.R50X/p.R602W	3
P30	F	29	NA	ND	p.R50X/p.R50X	1
P31	M	51	NA	ND	p.R771PfsX33 / p.R771PfsX33	1
P32	F	28	NA	ND	p.L5VfsX22 / p.K754NfsX49	2
P33	M	61	Q	0	p.G205S/p.G205S	1
P34	M	23	NA	ND	p.R50X/p.A660D	1
P35	M	21	NA	0	p.R50X/p.R50X	3
C1	F	28	Q			
C2	F	35	Q			
C3	F	23	B			
C4	M	27	B			
C5	M	43	B			
C6	F	50	B			
C7	F	42	B			

^aAge at the time the skeletal muscle biopsy was collected. ^bGP activity units are $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tissue. ^cMutations identified in the protein translation product are indicated by a “p” and in the transcript level by a “c” (www.hgvs.org/mutnomen). GenBank reference sequences were NP_005600.1 and NM_005609.1. ^dPatients’s clinical severity was classified based on a numerical scale following the criteria defined by Martinuzzi et al.[18]
Abbreviations: M, male; F, female; NA, data non available; B, biceps; Q, quadriceps; D, deltoid;; ND, not determined; PIM, possible intronic mutation.

Figure 1

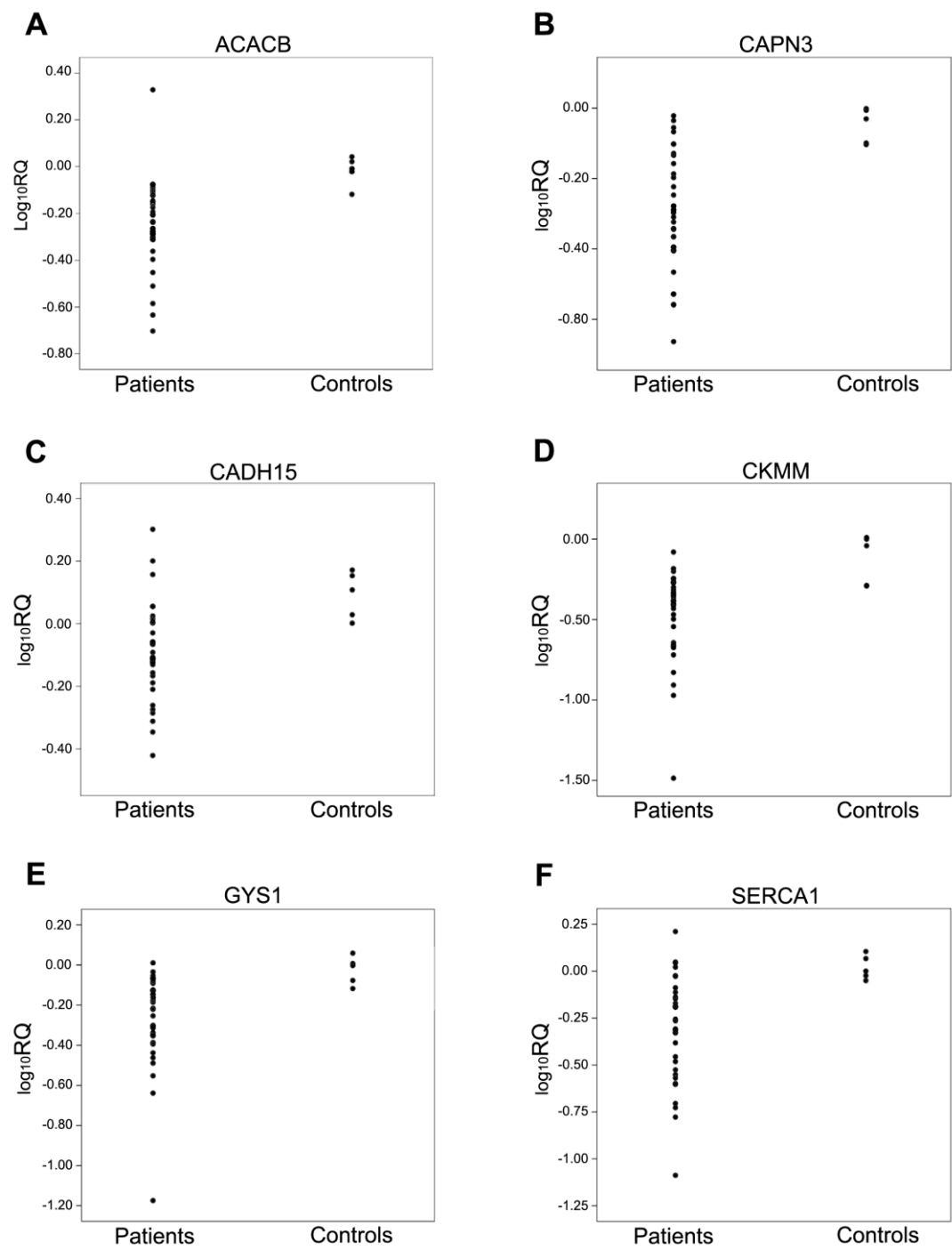


Figure 2

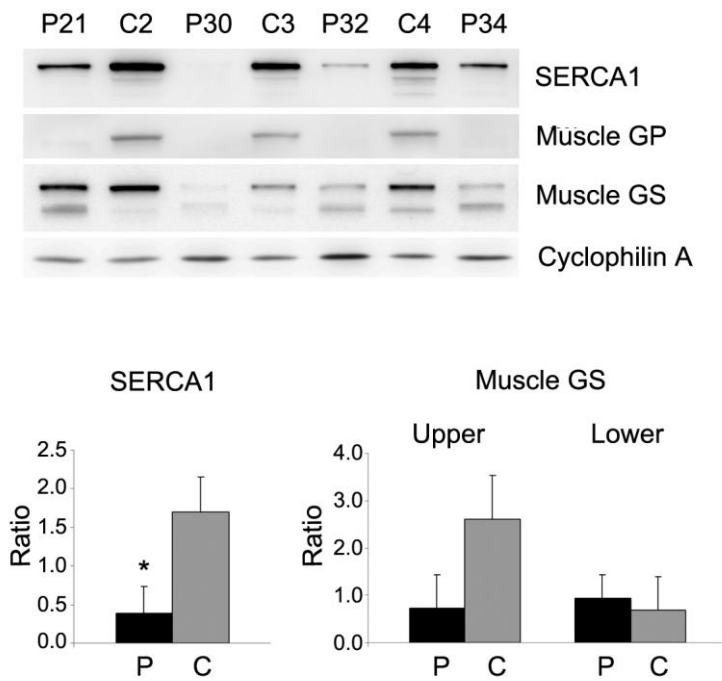


Figure 3

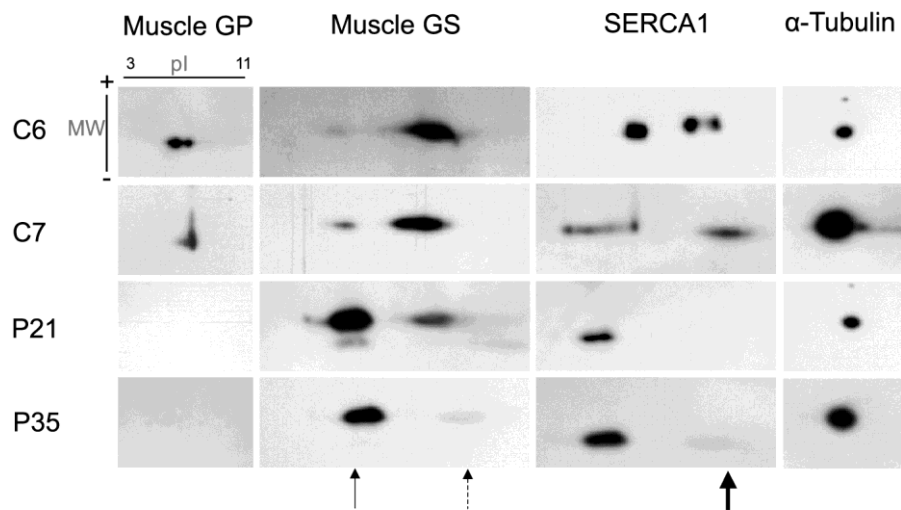


Figure 4

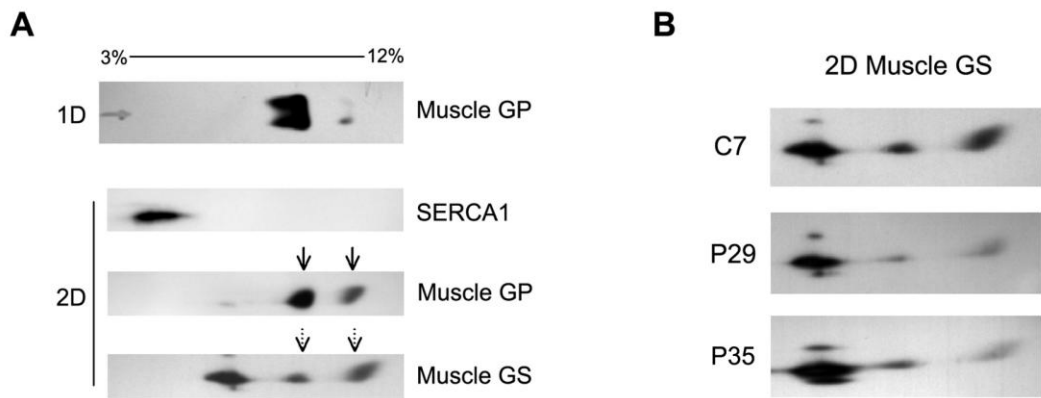
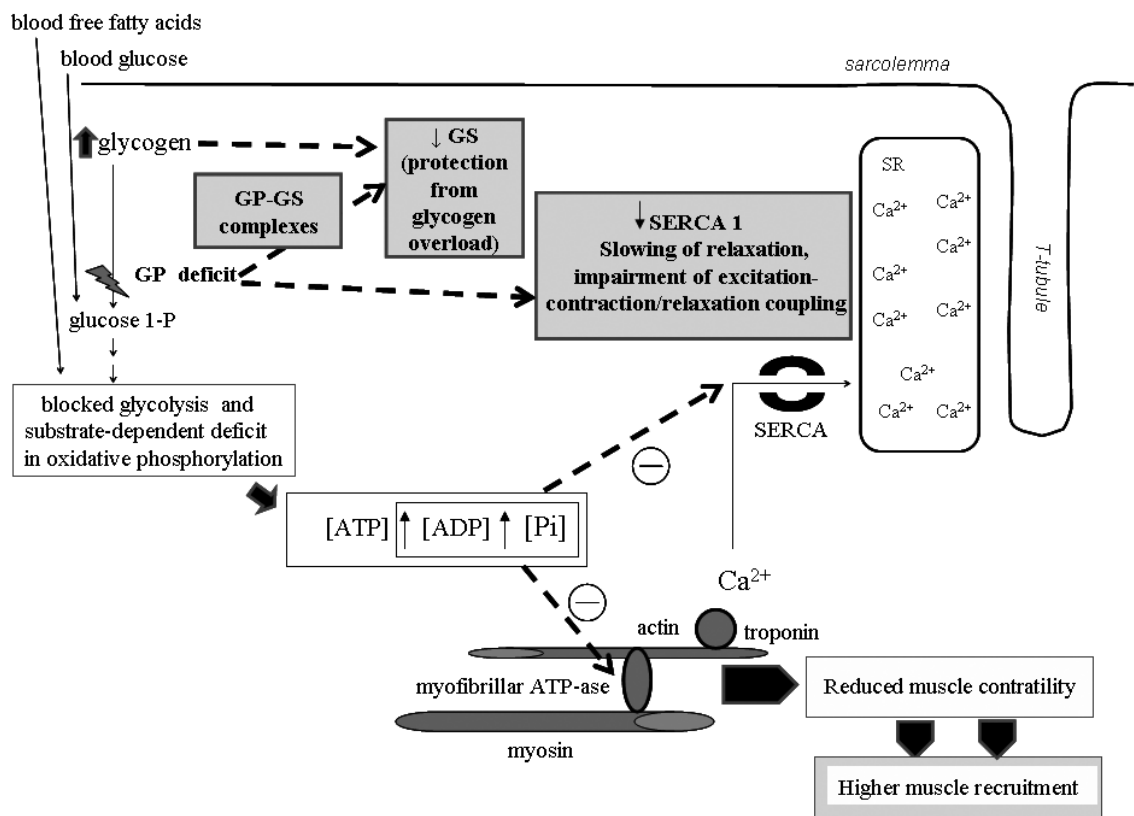


Figure 5



between patients and controls.

Supplementary Table 1: Genes studied in the customized low density array.

Gene Name	Gene symbol	TaqMan® Assay	Transcripts GenBank reference sequence
Acetil-CoA carboxylase beta	ACACB	Hs00153715_m1	NM_001093
Acetylcholine receptor, muscle, epsilon subunit	ACHRE	Hs00181084_m1	NM_000080.2
Acetil-CoA dehydrogenase medium chain	ACADM	Hs00163494_m1	NM_000016
Alpha-2 actinin	ACTN2	Hs00153809_m1	NM_001103
Alpha-3 actinin	ACTN3	Hs00153812_m1	NM_001104
Adenosine monophosphate deaminase I	AMPD1	Hs00163633_m1	NM_000036
Alpha keto acid dehydrogenase E1 subunit	BCKDE1A	Hs00167590_m1	NM_000709
Angiotensin I converting enzyme	ACE1	Hs00174179_m1	NM_000789/ NM_152830
ATP synthase 6, mitochondrial DNA encoded	MT-ATP6	Hs02596862_g1	Chr. MT - 8528 - 9208
Atrogin-1	ATROGIN	Hs_00369714_m1	NM_148177/ NM_058229
Calcineurin	CALNA	Hs_00174223_m1	NM_000944/ NM_001130691/ NM_001130692
Calpain III large subunit	CAPN3	Hs_00544982_m1	NM_173087/ NM_212464/ NM_212465/ NM_212467/ NM_024344/ NM_173088/ NM_173089/ NM_173090/ NM_000070
Carnitine acyltransferase I	CAT1	Hs_00241357_m1	NM_000755 / NM_004003
Caspase 8	CASP8	Hs_01018151_m1	NM_033358/ NM_033355/ NM_033356/ NM_001080124/ NM_001080125/ NM_001228
M-cadherine	CDH15	Hs_00170504_m1	NM_004933
Creatine kinase muscle type	CKMM	Hs_00176490_m1	NM_001824
Cytochrome b, mitochondrial DNA encoded	MT-CYB	Hs_02596867_s1	Chr. MT - 14748 - 15882
Cytochrome c	CYCS	Hs_01588974_g1	NM_018947
Cytochrome c oxidase subunit I, mitochondrial DNA encoded	MT-CO1	Hs_02596864_g1	Chr. MT - 5905 - 7446
Debranching enzyme	GDE	Hs_00240568_m1	NM_000642/NM_000028/NM_000643/ NM_000644/NM_000645/NM_000646
Desmin	DES	Hs_00157258_m1	NM_001927
Dinamin related protein 1	DRP1	Hs_00247147_m1	NM_012062/NM_012063/NM_005690

Dystrophin	DMD	Hs_00187805_m1	NM_004006/NM_000109/NM_004007/NM_004009/NM_004011/NM_004012/NM_004013/NM_004014/NM_004015/NM_004016/NM_004017/NM_004018/NM_004019/NM_004020/NM_004021/NM_004022/NM_004023/NM_004010
Glucose transporter 4	GLUT4	Hs_00168966_m1	NM_001042
Glycogen synthase muscle type	GYS1	Hs_00157863_m1	NM_002103
Heat shock 70 KD protein 2	HSPA2	Hs_00356607_g1	NM_021979
Kinase phosphorylase 1	PHKG1	Hs_00178864_m1	NM_006213
Monocyte chemotactic protein 1	MCP-1	Hs_00234140_m1	NM_002982
Ring finger protein 28	RNF28	Hs_00822397_m1	NM_032588
Myosin heavy chain 2	MYH2	Hs_00430042_m1	NM_001100112/ NM_017534
Myostatin	GDF8	Hs_00193363_m1	NM_005259
Nebulin	NEB	Hs_00189880_m1	NM_004543
Nuclear respiratory factor 1	NRF1	Hs_00602161_m1	NM_005011/ NM_001040110
Optic atrophy 1	OPA1	Hs_01047018_m1	NM_015560/NM_130831
Muscle phosphofructokinase	PFKM	Hs_00175997_m1	NM_000289
PPAR-gamma coactivator 1	PPARGC1A	Hs_00173304_m1	NM_013261
Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 1	SERCA1	Hs_00188877_m1	NM_173201/ NM_004320
Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 2	SERCA2	Hs_00544877_m1	NM_170665/ NM_001681
Superoxide dismutase 2	SOD2	Hs_00167309_m1	NM_001024465/ NM_001024466/ NM_000636
Succinyl CoA transferase	OXCT1	Hs_00166467_m1	NM_000436
Troponin c, slow-twitch skeletal muscle	TNNC1	Hs_00268524_m1	NM_003280
Troponin c, fast skeletal	TNNC2	Hs_00268519_m1	NM_003279
Tumor necrosis factor alpha	TNFA	Hs_00174128_m1	NM_000594
Ubiquinol cytochrome c reductase core protein	UQCRC1	Hs_00163415_m1	NM_003365
18s RNA	18S	Hs_99999901_s1	X03205
Large ribosomal protein	RPLPO	4333761T	NM_053275
Cyclophilin A	PPIA	Hs_99999904_m1	NM_021130
Transferrin receptor	TRCF	4333770F	NM_003234

Supplementary Table 2: Genes with expression statistically significant ($p < 0.05$) between patients and controls.

Gene	Group	Mean ($\log_{10}RQ$)	Standard Desviation ($\log_{10}RQ$)	P<0.05
ACTN2	Patients	-0.17	0.18	0.014
	Controls	0.11	0.17	
BCKDE1A	Patients	-0.38	0.26	0.046
	Controls	-0.14	0.14	
MYH2	Patients	-0.35	0.26	0.027
	Controls	-0.02	0.19	
OXTC1	Patients	-0.62	0.33	0.046
	Controls	-0.31	0.20	
PFKM	Patients	-0.19	0.19	0.012
	Controls	0.01	0.05	
PPARGC1A	Patients	-0.49	0.21	0.012
	Controls	0.20	0.13	
SOD2	Patients	-0.22	0.13	0.024
	Controls	-0.07	0.07	
TNNC1	Patients	-0.20	0.15	0.019
	Controls	0.02	0.13	
TNNC2	Patients	-0.50	0.23	0.012
	Controls	-0.15	0.10	
UQCRC1	Patients	-0.25	0.14	0.016
	Controls	-0.05	0.11	

